

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München



Funktionelle Charakterisierung von ATP13A2

Carolin Stephanie Schweimer
aus
München, Deutschland
2014

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Frau Prof. Dr. Konstanze F. Winklhofer betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe bearbeitet.

München, den

(Carolin Schweimer)

Dissertation eingereicht am:	12. Juli 2014
1. Gutachterin:	Prof. Dr. Konstanze F. Winklhofer
2. Gutachter:	Prof. Dr. Jörg Tatzelt
Mündliche Prüfung am:	24. Oktober 2014

Danksagung

Leider lässt sich wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken.

Johann Wolfgang von Goethe

Ich versuche es trotzdem:

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Konstanze Winklhofer: Dafür, dass ich an diesem spannenden Thema arbeiten durfte. Für angeregte, wissenschaftliche Diskussionen und ein stets offenes Ohr für die Probleme und Herausforderungen dieser Arbeit. Und natürlich für all die Unterstützung und die schönen Momente und Unternehmungen über die Wissenschaft hinaus.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens danke ich sehr Herrn Prof. Dr. Jörg Tatzelt.

Ein großes Dankeschön an Prof. Dr. Jörg Tatzelt, Prof. Dr. Stefan Zahler, Prof. Dr. Ernst Wagner, Dr. Stylianos Michalakis und Prof. Dr. Martin Biel, dass Sie meiner Prüfungskommission angehören.

Herrn Prof. Dr. Jörg Tatzelt danke ich für seine Bereitschaft, sich in jedes wissenschaftliche Problem hineinzudenken und seine vielen nützlichen Tipps. Und wer weiß, vielleicht wären ohne dich die Berge nicht mehr da!

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Christian Haass danke ich für interessante und anregende wissenschaftliche Gespräche bei Freitagsgesprächen und vor allem für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in München fertigstellen zu können.

Ein außerordentlicher Dank gilt meinen Kooperationspartnern. Ohne die Unterstützung und die bioanalytischen Daten von Dr. Dietrich Trümbach wäre ein großer Teil dieser Arbeit kaum möglich gewesen. Ein weiterer Dank gilt Dr. Michael Greeff und Ulrich Neumaier für ihre Textmining-Arbeit, die interessante Zusammenhänge aufgewiesen hat. Ein Dank gilt auch Friederike Saarhoff und Simon Hirschberger vom Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie und Anne Behrendt vom Institut für Immunologie für die sehr nette Zusammenarbeit und die Produktion toller Seahorse-Daten. Ein weiterer Dank geht an Prof. Dr. Stefan Eimer und Dr. Nora Wender für ihre Zusammenarbeit.

Bedanken möchte ich mich vor allem auch bei Anna Pils, Kathrin Müller-Rischart, Maria Sadic, Maria Patra und Vanessa Welk, die durch ihre tatkräftige Unterstützung wichtige Beiträge zu dieser Arbeit beigesteuert haben.

Danke Richie für deine Anleitung durch den L^AT_EX Dschungel und deine Hilfe bezüglich aller IT-Fragen, die mir so eingefallen sind. Danke an Tina, Maria, Maria und Eva für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ein großer Dank geht auch an alle aktuellen und ehemaligen Kollegen des Lehrstuhls Haass für ihre Unterstützung, die tolle Zusammenarbeit und die große Hilfsbereitschaft. Es hat sehr viel Spaß gemacht, hier zu arbeiten, vor allem auch wegen des angenehmen Arbeitsklimas.

Liebe Tatzelt-Mädls, vielen Dank für eure Unterstützung, egal bei welchen Fragen, ob Klonierung oder S2 oder Mitotracker. Danke Veronika, für deine Unterstützung und dass man mit dir alles besprechen konnte. Das hat mir immer sehr geholfen. Ein besonderer Dank geht an unsere “Raumteiler“ Nicole und Bettina für das gute Zusammenleben im Labor im achten Stock und all die nützlichen Tipps. Darüber hinaus möchte ich mich besonders bei Sabine Odoy, Annette Schell, Barbara Kassner, Benno Fredmüller und Karin Gippmann bedanken, ohne deren vielseitige Hilfe das Leben oft sehr viel schwerer gewesen wäre.

Ein weiterer großer Dank gilt all den Mädls der Arbeitsgruppe Winklhofer. Ohne eure großartige Zusammenarbeit, Unterstützung und Hilfe und vor allem ohne unseren ganz außerordentlich großen Spaß, den wir gemeinsam hatten, wäre alles schwer erträglich gewesen.

Vanessa, ich danke dir für deine Zusammenarbeit und deine Unterstützung. Die Betreuung deiner Masterarbeit hat mir viel Spaß gemacht und ich habe viel gelernt.

Kathrin, Maria, Eva, Matthias, Daniel und Benni, ich bin unglaublich froh, dass wir nicht nur Kollegen, sondern Freunde geworden sind. Danke für legendäre Mittagsrunden und Kaffeepausen, für so unglaublich viele lustige Momente, philosophische Gespräche und tolle Unternehmungen.

Liebe Tina, danke für deine Freundschaft und Unterstützung - nicht nur bei wissenschaftlichen Fragestellungen, sondern auch für unsere “befreienden“ Gespräche.

Vielen Dank auch an meine Freunde, insbesondere an Julia. Mit euch habe ich immer den richtigen Ausgleich zu meiner Arbeit gefunden.

Mein größter Dank geht an meinen Freund Simon und meine Familie.

Simon, danke dafür, dass diesen Weg mit mir gegangen bist, für deine uneingeschränkte Unterstützung und dein Verständnis. Und dass du meinen Alltag mit so vielen spontanen und nicht selten etwas verrückten Ideen bereicherst.

Liebe Mama und lieber Papa, danke dass ihr mir all das ermöglicht habt. Ohne eure Unterstützung, euren Rückhalt und euer Vertrauen hätte ich es nie so weit geschafft!

*Es gibt keine gescheiterten Experimente, sondern nur Experimente mit unerwartetem
Ausgang!*

R. Buckminster Fuller

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

XVIII

1	Kurzfassung	1
2	Abstract	3
3	Einleitung	5
3.1	ATP13A2	5
3.1.1	ATP13A2 als Ursache des Kufor-Rakeb-Syndroms	5
3.1.2	ATP13A2 - eine P-Type ATPase	5
3.1.2.1	Struktur und funktionelle Aspekte von ATP13A2	5
3.1.2.2	Lysosomen	10
3.1.2.3	P-Typ ATPasen	12
3.1.2.3.1	Typ V P-Typ ATPasen	12
3.1.2.3.2	Struktur und Funktionsweise von P-Typ ATPasen	13
3.2	ATP13A2 und Morbus Parkinson	14
3.2.1	Morbus Parkinson	15
3.2.1.1	Symptome und Diagnose	15
3.2.1.2	Ätiologie	16
3.2.1.3	Neuropathologie und Therapie	16
3.2.1.4	Ursachen	17
3.2.2	Mit Parkinsonismus assoziierte Gene	18
3.2.2.1	Autosomal dominant vererbte Gene	19
3.2.2.2	Autosomal rezessiv vererbte Gene	20
3.2.3	Signalwege, die bei Parkinsonismus beeinflusst sind	21
3.2.3.1	Parkinsonismus und Mitochondrien	21
3.2.3.1.1	Inhibition des Komplex I der Atmungskette und oxidativer Stress	21
3.2.3.1.2	Mitochondriale Funktion	22
3.2.3.1.3	Mitochondriale Dynamik	24
3.2.3.1.4	Die Beeinflussung der mitochondrialen Dynamik durch Parkinsonismus-assoziierte Gene	24
3.2.3.1.5	Mitophagie	25
3.2.3.2	Zellprotektion	27
3.2.3.2.1	Apoptose	27

XIII

3.2.3.2.2	Zellprotektive Kapazitäten Parkinsonismus-assoziiierter Gene	29
3.3	Transkriptionelle Regulation mitochondrialer Biogenese	31
3.4	Ziele dieser Arbeit	34
4	Ergebnisse	35
4.1	Topologie und subzelluläre Lokalisation von ATP13A2	35
4.1.1	ATP13A2 ist ein großes Transmembranprotein	35
4.1.2	ATP13A2 ist ein lysosomales Membranprotein	36
4.1.3	Überexprimiertes ATP13A2 kann im <i>Western Blot</i> detektiert werden	39
4.1.4	Wildtyp ATP13A2 und die KRS-assoziierten Mutanten werden unterschiedlich abgebaut	39
4.1.5	Identifizierung der lysosomalen Signalsequenz von ATP13A2	41
4.1.5.1	Mutationen der möglichen Signalsequenz hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von ATP13A2	42
4.1.5.2	Eine Deletion des N- und C-Terminus von ATP13A2 führt zur Fehllokalisierung des Proteins ins ER	43
4.2	Der Einfluss von ATP13A2 auf Zellorganellen	46
4.2.1	Etablierung des <i>Knockdowns</i> von ATP13A2 als Modell	47
4.2.1.1	Etablierung eines transienten <i>Knockdowns</i> von ATP13A2 .	47
4.2.1.2	Etablierung eines stabilen <i>Knockdowns</i> von ATP13A2 . .	48
4.2.2	Die lysosomale Verteilung und Aktivität bleibt durch einen ATP13A2 <i>Knockdown</i> unbeeinflusst	48
4.2.2.1	Die Verteilung, Morphologie und Aktivität der Lysosomen ist im ATP13A2 <i>Knockdown</i> nicht beeinträchtigt	49
4.2.2.2	ATP13A2 und ein möglicher Einfluss auf Mitophagie . . .	50
4.2.2.2.1	Mitophagie wird durch eine Überexpression von ATP13A2 nicht beeinflusst	51
4.2.2.2.2	Mitophagie wird durch einen <i>Knockdown</i> von ATP13A2 nicht beeinflusst	52
4.2.3	Die mitochondriale Morphologie und Funktion weist im ATP13A2 <i>Knockdown</i> Veränderungen auf	53
4.2.3.1	Mitochondrien kondensieren im ATP13A2 <i>Knockdown</i> um den Zellkern	53
4.2.3.2	Die ATP-Produktion ist im ATP13A2 <i>Knockdown</i> beeinträchtigt	55

4.2.3.3	ATP13A2 revertiert die α -Synuklein-induzierte mitochondriale Fragmentierung	56
4.2.3.4	Die PRKA wird durch ATP13A2 beeinflusst	59
4.3	Regulation von <i>ATP13A2</i>	60
4.3.1	Die Expression von <i>ATP13A2</i> wird durch zellulären Stress reguliert	60
4.3.1.1	Die Expression von <i>ATP13A2</i> wird in Säugerzellen durch unterschiedlichen zellulären Stress induziert	61
4.3.1.2	Die Expression von <i>ATP13A2</i> wird auch in primären Zellen durch Stress induziert	64
4.3.2	Bioinformatische Analyse des <i>ATP13A2</i> Promotors	64
4.3.3	NRF1 ist ein Transkriptionsfaktor für <i>ATP13A2</i>	65
4.3.3.1	Klonierung eines Reporter-Luziferase-Konstrukts	66
4.3.3.2	Klonierung verschiedener NRF1-Konstrukte	66
4.3.3.3	NRF1 induziert die Transkription des ATP13A2 Promotors	67
4.3.3.4	NRF1 induziert die Expression von <i>ATP13A2</i> auf mRNA Ebene	69
4.3.3.5	<i>NRF1</i> wird nach Stress im selben Maße reguliert wie <i>ATP13A2</i>	70
4.3.4	PGC-1 α reguliert die Transkription von <i>ATP13A2</i>	71
4.3.4.1	PGC-1 α induziert die Transkription des ATP13A2 Reporter-Konstrukts	71
4.3.4.2	PGC-1 α induziert <i>ATP13A2</i> auf mRNA Ebene	72
4.3.4.3	Ein Verlust von PGC-1 α hat Einfluss auf <i>ATP13A2</i>	72
4.3.4.3.1	Der PGC-1- <i>Knockdown</i> reduziert NRF1 Mengen	73
4.3.4.3.2	Der PGC-1- <i>Knockdown</i> reduziert ATP13A2 Mengen	74
4.4	ATP13A2 beeinflusst das Überleben von Zellen	75
4.4.1	Eine Reduktion von ATP13A2 führt zu eingeschränktem Wachstum	75
4.4.2	Eine Reduktion der ATP13A2 Mengen macht Zellen anfälliger gegen Stress	76
4.4.3	Höhere ATP13A2 Mengen schützen vor Stress-induzierter Apoptose	77
5	Diskussion	79
5.1	Funktionelle Charakterisierung von ATP13A2	80
5.1.1	Die Struktur von ATP13A2 gibt Hinweise auf seine Funktion	80
5.1.2	ATP13A2 und seine Rolle in der lysosomalen Funktion	82
5.1.3	ATP13A2 und seine Verbindung zu den Mitochondrien	85
5.1.4	NRF1 reguliert die Transkription von <i>ATP13A2</i>	87

5.2	Die Parkinsonismus-assoziierten Gene lassen auf gemeinsame Pathomechanismen schließen	90
6	Material und Methoden	92
6.1	Material	92
6.1.1	Zellkultur	92
6.1.1.1	Zellkulturstämme	92
6.1.1.2	Bakterien	92
6.1.1.3	Medien	93
6.1.1.4	Reagenzien	93
6.1.1.5	Antibiotika	94
6.1.1.6	Zubehör	94
6.1.2	Konstrukte und Oligonukleotide	94
6.1.2.1	Plasmide	94
6.1.2.1.1	Leervektoren	94
6.1.2.1.2	DNA-Konstrukte	94
6.1.3	Primer und Oligonukleotide	96
6.1.3.1	Klonierungsprimer und Oligonukleotide	96
6.1.3.2	RTPCR Primer	98
6.1.3.3	siRNAs	99
6.1.3.4	shRNAs	99
6.1.4	Enzyme und Proteine	100
6.1.5	Antikörper	100
6.1.5.1	Primäre Antikörper	100
6.1.5.2	Sekundäre Antikörper	102
6.1.6	Farbstoffe und Marker	102
6.1.7	Kits	102
6.1.8	Toxine und Inhibitoren	103
6.1.9	Puffer und Reagenzien	103
6.1.10	Geräte	104
6.1.11	Software	106
6.2	Methoden	106
6.2.1	Zellkultur	106
6.2.1.1	Kultivierung von Zellen	106
6.2.1.1.1	Kultivierung verschiedener Zelllinien	106
6.2.1.1.2	Präparation primärer muriner embryonaler Fibroblasten	106

6.2.1.1.3	Präparation primärer kortikaler Neuronen aus Mäusembryos	107
6.2.1.2	Transiente Transfektion	107
6.2.1.2.1	Ausplattieren von Zellen	107
6.2.1.2.2	Überexpression unterschiedlicher DNA-Konstrukte	108
6.2.1.2.3	Transiente Transfektion von siRNA	108
6.2.1.3	stabile Transduktion	109
6.2.1.3.1	Generierung stabiler ATP13A2 <i>Knockdown</i> -Zellen	109
6.2.1.3.2	Generierung stabiler ATP13A2 Überexpressions-Zellen	109
6.2.1.4	Bestimmung der Wachstumsrate mittels Zellzählung	110
6.2.1.5	Behandlung der Zellen mit Toxinen und Inhibitoren	110
6.2.1.6	Zellernte	110
6.2.2	Nukleinsäuremethoden	110
6.2.2.1	Klonierungen	110
6.2.2.1.1	DNA-Expressionskonstrukte	110
6.2.2.1.2	Polymerase-Kettenreaktion	112
6.2.2.1.3	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	113
6.2.2.1.4	Restriktionsverdau	113
6.2.2.1.5	Ligation	113
6.2.2.1.6	<i>InFusion Cloning</i>	113
6.2.2.1.7	Transformation von DNA in kompetente Bakterien	114
6.2.2.1.8	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	114
6.2.2.1.9	Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren am Nano Drop	114
6.2.2.1.10	Isolierung von cDNA aus SH-SY5Y-Zellen	114
6.2.2.2	RNA-Arbeiten	114
6.2.2.2.1	Isolierung von RNA	114
6.2.2.2.2	cDNA Synthese	115
6.2.2.2.3	Semi-quantitative <i>real-time</i> -PCR	115
6.2.3	Proteinanalytische Methoden	116
6.2.3.1	Allgemeine Vorarbeiten	116
6.2.3.1.1	Zelllyse	116
6.2.3.1.2	Proteinbestimmung	116
6.2.3.2	<i>Western Blot</i>	116
6.2.3.2.1	SDS-PAGE	116
6.2.3.2.2	Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen	117

6.2.3.3	Luziferase-Reporter- <i>Assay</i>	117
6.2.3.4	ATP- <i>Assay</i>	118
6.2.3.5	Immunfluoreszenzfärbungen	118
6.2.3.5.1	Caspase- <i>Assay</i>	118
6.2.3.5.2	Untersuchung der mitochondrialen Morphologie .	119
6.2.3.5.3	Mitophagie- <i>Assay</i>	119
6.2.4	Promotoranalyse	119
6.2.5	Statistische Analyse	120
7	Formelzeichen und Abkürzungen	121
	Formelzeichen und Abkürzungen	121
8	Anhang	123
8.1	Vektorkarten	123
8.2	Publikationen und Poster	127
8.2.1	Publikationen, die im Laufe dieser Arbeit entstanden sind	127
8.2.2	Poster, die im Laufe dieser Arbeit entstanden sind	127
9	Literaturverzeichnis	128

1 Kurzfassung

Mutationen im *ATP31A2*-Gen sind Ursache des Kufor-Rakeb-Syndroms, einer Form des Parkinsonismus mit jungem Krankheitsbeginn, und wurden außerdem auch in Morbus Parkinson Fällen entdeckt. ATP13A2 kodiert eine Typ V P-Typ ATPase, die für den Erhalt eines Ionengradienten über die lysosomale Membran hinweg verantwortlich ist. Die genaue Funktion des Proteins ist bislang aber weitgehend unbekannt. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit verschiedene funktionelle und regulatorische Aspekte dieses Proteins charakterisiert.

Durch Lokalisationsstudien konnten wir ATP13A2 als lysosomales Membranprotein bestätigen. Mutationen im Protein führten zu einer Fehllokalisierung der Mutanten ins Endoplasmatische Retikulum und ihrem raschen Abbau über das Proteasom. Das traf sowohl auf die schon von Ramirez *et al.* beschriebenen, krankheitsassoziierten Mutationen delC, S13 und i16 zu (Ramirez *et al.* (2006)), als auch auf von uns neu generierte Deletionsmutanten, denen kurze Teile des N- bzw. C-Terminus des Proteins fehlten. Da es sich bei den Mutanten um *loss-of-function* Mutationen handelt, sollten die Konsequenzen eines Verlusts von ATP13A2 in einem *Knockdown*-Modell in humanen und murinen Zellen analysiert werden.

Das Wildtyp Protein ist in der lysosomalen Membran lokalisiert, daher liegt die Annahme nahe, dass ATP13A2 zur lysosomalen Funktion beiträgt. Ein Verlust der lysosomalen Funktion könnte eine lysosomale Störung nach sich ziehen. Die Analyse lysosomaler Charakteristika und Funktionen nach einem Verlust von ATP13A2 ergab allerdings keine mit unseren Methoden fassbare Veränderungen. Sowohl die lysosomale Morphologie und Masse, als auch die Maturierung des lysosomalen Enzyms Cathepsin D war unter ATP13A2 *Knockdown*-Bedingungen nicht beeinträchtigt. Auch die lysosomale Funktion in Form von Mitophagie, dem selektiven Abbau defekter Mitochondrien, war im *Knockdown* von ATP13A2 nicht beeinträchtigt.

Im Zuge der Untersuchungen zur Mitophagie konnten allerdings Veränderungen an den Mitochondrien festgestellt werden. Ein ATP13A2 *Knockdown* führte zu einer Kondensierung der Mitochondrien um den Kern, die mit einer leichten Reduktion der Gesamt-ATP-Menge in der Zelle einherging. In weiteren Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass ATP13A2 die durch α -Synuklein induzierte mitochondriale Fragmentierung revertierte und somit eine weitere Verbindung zur mitochondrialen Morphologie aufwies. Als mögliche Ursache für die mitochondrialen Veränderungen konnten wir einen Zusammenhang zwischen ATP13A2 und Regulatoren des bioenergetischen Status der Zelle identifizieren. Ein *Knockdown* von ATP13A2 führte zu einer Reduktion der AMP-regulierten Protein

Kinase (PRKA). Die PRKA wird allgemein als “Energiesensor“ der Zelle bezeichnet und reguliert das Verhältnis zwischen anabolen und katabolen Signalwegen. Sie kontrolliert so den Energiehaushalt der Zelle. Dies kann u.a. durch Regulation der mitochondrialen Biogenese geschehen.

Dass ATP13A2 tatsächlich in Zusammenhang mit dem Energiehaushalt der Zelle steht, beweist seine transkriptionelle Regulation durch die Transkriptionsfaktoren *Peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 α* (PGC-1 α) und *nuclear respiratory factor 1* (NRF1). Beide Transkriptionsfaktoren sind v.a. für die Regulation der mitochondrialen Biogenese entscheidend und nehmen so Einfluss auf den Energiehaushalt der Zelle. Nachdem wir feststellen konnten, dass es sich bei *ATP13A2* um ein durch verschiedene Stressoren auf mRNA Ebene induzierbares Gen handelt, identifizierten wir durch bioinformatische Analyse des ATP13A2 Promotors zahlreiche Bindestellen für den Transkriptionsfaktor NRF1. Im Folgenden konnte NRF1 als Transkriptionsfaktor von *ATP13A2* bestätigt werden, ebenso wie sein Kofaktor PGC-1 α . In Folge der Hochregulation von ATP13A2 weist das Protein zellprotektive Eigenschaften auf. Eine Überexpression von ATP13A2 konnte vor Stress-induziertem Zelltod schützen. Im Umkehrschluss bestätigte sich, dass ein Verlust von ATP13A2 zu einer erhöhten Stressanfälligkeit der Zellen und vermehrtem Zelltod führte.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass ein Verlust von ATP13A2 zwar keinen Einfluss auf die lysosomale Funktionalität besitzt, aber zu mitochondrialen Veränderungen führt. ATP13A2 ist ein Stress-induzierbares Protein und besitzt zellprotektive Eigenschaften. Seine transkriptionelle Regulation erfolgt über NRF1 und PGC-1 α .

2 Abstract

Mutations in the *ATP13A2* gene cause Kufor-Rakeb syndrome (KRS), an autosomal recessive form of parkinsonism with juvenile onset, and were found also in Parkinsons disease. As ATP13A2 encodes a Type V P-type ATPase it maintains an ion gradient across cellular membranes. The exact function of the protein is unknown up to now, therefore we characterized different functional and regulatory aspects of the protein.

Localization studies confirmed ATP13A2 as a lysosomal membrane protein. The KRS-associated mutations delC, S13 and i16 (Ramirez et al. (2006)), as well as our newly generated deletion mutations with a shorter N- and C-terminus, led to a mislocalization of the protein to the endoplasmatic reticulum and a fast degradation via the proteasom. All mutations result in a loss-of-function of ATP13A2 protein. The consequences of this loss of ATP13A2 function were analyzed in a cellular knockdown model.

Because of the lysosomal localization of wildtype ATP13A2 an impact of ATP13A2 mutations on lysosomal functions could be concluded. However the analysis of lysosomal function in the ATP13A2 knockdown model revealed no obvious differences. Lysosomal morphology and mass, as well as the maturation of the lysosomal enzym cathepsin D were not changed in the knockdown situation. Mitophagy, the selective degradation of damaged mitochondria, was also not impaired in ATP13A2-deficient cells.

Although the analysis of mitophagy displayed no changes in lysosomal function changes in mitochondrial morphology could be identified. A knockdown of ATP13A2 led to a condensation of mitochondria around the nucleus combined with a reduction of cellular ATP levels. Further analysis confirmed a connection of ATP13A2 and mitochondria. ATP13A2 was able to rescue α -synuclein induced mitochondrial fragmentation. As a possible reason for mitochondrial changes we identified an influence of ATP13A2 on the bioenergetic status of the cell. Knockdown of ATP13A2 reduced the levels of *AMP-activated protein kinase* (PRKA), the “energy sensor“ of the cell. PRKA controls energy homeostasis of cells and regulates the ratio of anabolic to catabolic signaling pathways, e.g. via mitochondrial biogenesis.

Further analysis confirmed that ATP13A2 is indeed connected to the bioenergetic status of the cells. ATP13A2 is transcriptionally regulated by the transcription factors *Peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 α* (PGC-1 α) and *nuclear respiratory factor 1* (NRF1). Both transcription factors are responsible for the regulation of mitochondrial biogenesis, thus influencing the energetic status of the cell. After confirming ATP13A2 being a stress-inducible gene we identified in a bioinformatical analysis several binding

sites for the transcription factor NRF1. In different experiments we proved NRF1 as well as its co-factor PGC-1 α as transcription factors for ATP13A2. As a result of increase ATP13A2 expression after stress cells were protected against cellular stress. In contrast a loss of ATP13A2 makes cells more vulnerable to stress-induced apoptosis.

In summary, we could clearly demonstrate that a loss of ATP13A2 has no influence on lysosomal function but leads to changes in mitochondrial morphology. ATP13A2 is a stress-inducible and stress-protective protein. It is transcriptionally regulated by NRF1 and PGC-1 α .

3 Einleitung

3.1 ATP13A2

3.1.1 ATP13A2 als Ursache des Kufor-Rakeb-Syndroms

1994 wurden fünf Patienten von Najim al-Din *et al.* beschrieben, die Symptome eines pallido-pyramidalen Syndroms, eine supranukleäre Blickparese sowie Parkinson-ähnliche Symptome und eine Demenz aufwiesen (Najim al Din et al. (1994)). Die Symptome manifestierten sich bereits im jugendlichen Alter und schritten rasch fort, so dass eine volle Pflegebedürftigkeit nach etwa zwei Jahren entstand. Alle fünf Patienten waren Kinder eines blutsverwandten Elternpaares aus Jordanien, nach deren Wohnort dieses neue Syndrom auch benannt wurde, das Kufor-Rakeb-Syndrom (KRS). Die initialen Symptome eines maskenhaften Gesichts, Steifigkeit und Bradykinesie - eine Verlangsamung der Bewegungen - legen einen fortschreitenden Verlust der dopaminergen Neuronen nahe, wie es auch bei Morbus Parkinson der Fall ist. Diese Symptome des KRS sprechen sehr gut auf eine L-Dopa-Therapie an. MRT Hirn-Aufnahmen zeigen eine anfängliche Atrophie des *Globus Pallidus* und der Pyramidenbahnen, die später in eine generelle Hirnatrophie übergeht (Najim al Din et al. (1994); Williams et al. (2005), Behrens et al. (2010)).

KRS wird autosomal rezessiv vererbt. In den betroffenen Patienten konnte ein 9 cM großer für die Krankheit verantwortlicher Genabschnitt auf Chromosom 1p36 identifiziert werden (Hampshire et al. (2001)). Ramirez *et al.* konnten Mutationen im sich auf diesem Abschnitt befindlichen Gen *ATP13A2* als ursächlich für KRS beschreiben (Ramirez et al. (2006)).

3.1.2 ATP13A2 - eine P-Type ATPase

3.1.2.1 Struktur und funktionelle Aspekte von ATP13A2

ATP13A2 kodiert eine Typ V P-Typ ATPase (Ramirez et al. (2006)) und erstreckt sich über 26 kb mit 29 Exons. Durch unterschiedliches *Splicing* entstehen drei verschiedene Proteine. Das größte Protein (Isoform 1) besteht aus 1180 Aminosäuren, die etwas kürzere Isoform 2 aus 1175 Aminosäuren. Nahe des N-Terminus liegt hier eine *in-frame* Deletion von fünf Aminosäuren vor. In dieser Arbeit wurde mit Isoform 2 gearbeitet. Isoform 3 zeigt deutlichere Veränderungen. Hier fehlen weitere 39 Aminosäuren näher am C-Terminus in Kombination mit Sequenzveränderungen im C-Terminus, was mit 1158 Aminosäuren zu einem kürzeren Protein mit deutlich verändertem C-Terminus führt (uniprot.org (a)). Die Konsequenzen, die sich aus diesen Veränderungen ergeben, sind bislang noch unbekannt.

Für Isoform 1 und 2 ergibt sich durch computerbasierte Strukturvorhersagen ein Protein mit zehn Transmembrandomänen, das in der lysosomalen Membran lokalisiert ist und dessen N- und C-Terminus im Zytosol liegen (ch.embnet.org; Ramirez et al. (2006)). Die molekulare Masse beläuft sich auf etwa 130 kDa. Durch Analyse der jordanischen KRS-Familie, sowie einer chilenischen Familie, konnten drei pathogene Mutationen entdeckt werden. Bei der ersten Mutation handelt es sich um die Deletion eines Cytosins an Position 3057 in Exon 26, was zu einer Verschiebung des Leserahmens und einem vorzeitigen Stopcodon führt (Mutation delC). Die zweite Mutation kennzeichnet sich durch einen Austausch von Guanin durch Adenin in Exon 13. Da die Mutation in der Nähe der *Splice*-Stelle positioniert ist, verläuft das *Splicing* nicht mehr korrekt und Exon 13 geht im mutierten Protein verloren (Mutation S13). Im dritten Fall liegt eine Duplikation von 22 Basenpaaren in Exon 16 vor, die wie auch bei delC zu einer Verschiebung des Leserahmens und einem vorzeitigen Stopcondon führt (Mutation i16). Die Mutationen konnten eindeutig mit KRS assoziiert werden und liegen nicht in Kontrollgruppen vor (Ramirez et al. (2006)). Durch die Mutationen kommt es zu starken Veränderungen in der Proteinstruktur, da die vorzeitigen Stopcodone zu einem Verlust von Transmembrandomänen führen (Abb. 3.1). Die entstehenden Proteine sind sehr instabil und gelangen gar nicht erst an ihren Zielort sondern werden über das Proteasom abgebaut (Ramirez et al. (2006)).

In Analysen anderer Forschungsgruppen konnten weitere mit KRS-assoziierte Mutationen gefunden werden, die sich ähnlich wie die oben beschriebenen Mutationen verhalten. So zeigt z.B. die hetero-*compound* vererbte Mutation c.3176T>G & c.3253delC ebenfalls eine Fehllokalisation des Proteins von den Lysosomen in das ER, eine deutliche Instabilität und proteasomalen Abbau (Park et al. (2011)).

Tabelle 3.1 – Mutationen, die mit dem Kufor-Rakeb-Syndrom assoziiert sind.

Aminosäurewechsel	Basenwechsel	Zygosität	Herkunft	Referenz
Gly504Arg	G1510C	homozygot	Brasilien	Di Fonzo et al. (2007)
Phe182Leu	c.546C>A	homozygot	Japan	Ning et al. (2008)
Thr367Arg fsX29	1103_1104insGA	homozygot	Pakistan	Schneider et al. (2010)
Thr367Arg fsX29	1103_1104insGA	homozygot	Brasilien	Paisán-Ruiz et al. (2010)
Leu1059Ag & Leu1085 fs X1088	c.3176T>G & c.3253delC	<i>compound-</i> heterozygot	Asien	Park et al. (2011)
Gly877Arg	c.2629G>A	homozygot	Italien	Santoro et al. (2011)
Phe851fs	c.2742_2743delTT	homozygot	Afghanistan	Crosiers et al. (2011)
Phe851fs	c.2473C>AA	homozygot	Inuit	Eiberg et al. (2012)

ATP13A2 Wildtyp (Isoform 2):

MSADSSPLVGSTPTGYGTLTIGTSIDPLSSSVSSVRLSGYCGSPWRVIGYHVVVWMMAGIPLLLFRWKPLWGVRL
 RLRPCNLHAETLVIEIRDKEDSSWQLFTVQVQTEAIGESLEPSPQSQAEDGRSQAAGVAVPEGAWKDTAQLHK
 SEEAKRVLRYLFGGQRYIWETQQAFYQVSLLDHGRSCDDVHRSRHGLSLQDQMVRKAIYGNVISIPVKSYPQ
 LLVDEALNPYYGFQAFSIALWLADHYWYALCIFISSISICLSLYKTRKQSQTLDMMVKLSMRVCVCRPGGEEE
 WVDSSSELVPGDCLVLPQEGGLMPCDAALVAGECMVNESSLTGESIPVLKTALPEGLGPYCAETHRRHTLFCGTLI
 LQARAYVGPVHLAVVTRTGCTAKGGLVSSILHPRPINFKFYKHSMMKFVAALSVLALLGTIYSIFILYRNRVPLN
 EIVIRALDLVTVVVPALPAAMTVCTLYAQSRLRRQGIFCIHPLRINLGGKLQLVCFDKTGTLTEDGLDVMGVVP
 LKGQAFPLVPEPRRLPVGPPLRALATCHALSRLQDTPVGDPMDLKMVESTGWVLEEEPAADSAFGTQVLAVMRP
 PLWEPQLQAMEEPPVPVSVLHRRFPFSSALQRMSVVVAWPGATQPEAYVKGSPELVAGLCNPETVPTDFAQMLQSY
 TAAGYRVVALASKPLPTVPSLEAAQQLTRDTVEGDLSLLGLLVMRNLLKPQTTPVIQALRRTRIRAVMVTGDNLQ
 TAVTVARGCGMVAPQEHLIVHATHPERGQPASLEFLPMESPTAVNGVKDPDQAASYTVEPDPRSRHLALSGPTF
 GIIVKHFPKLLPKVLVQGTVFARMAPEQKTELVCLEQLQYCVGMCGDGANDCGALKAADVGISLSQAEASVSP
 FTSSMASIECPMVIREGRCSLDTSFSVFKYMALYSLTQFISVLILYINTNLGDLQFLAIDLVTITTVAVLMSR
 TGPALVLGRVRPPGALLSVPVLSSLLQMVLTGVQLGGYFLTLAQPFVPLNRTVAAPDNLPNYENTTVFSLSS
 FQYLILAAVSKGAPFRRPLYTNVPFLVALALLSSVLVGLVLVPGLLQGPLALRNITDTGFKLLLLGLVTLNFVG
 AFMLESVLDQCLPACLRRLRPKRASKKRFKQLERELAEQPWPPLPAGPLR

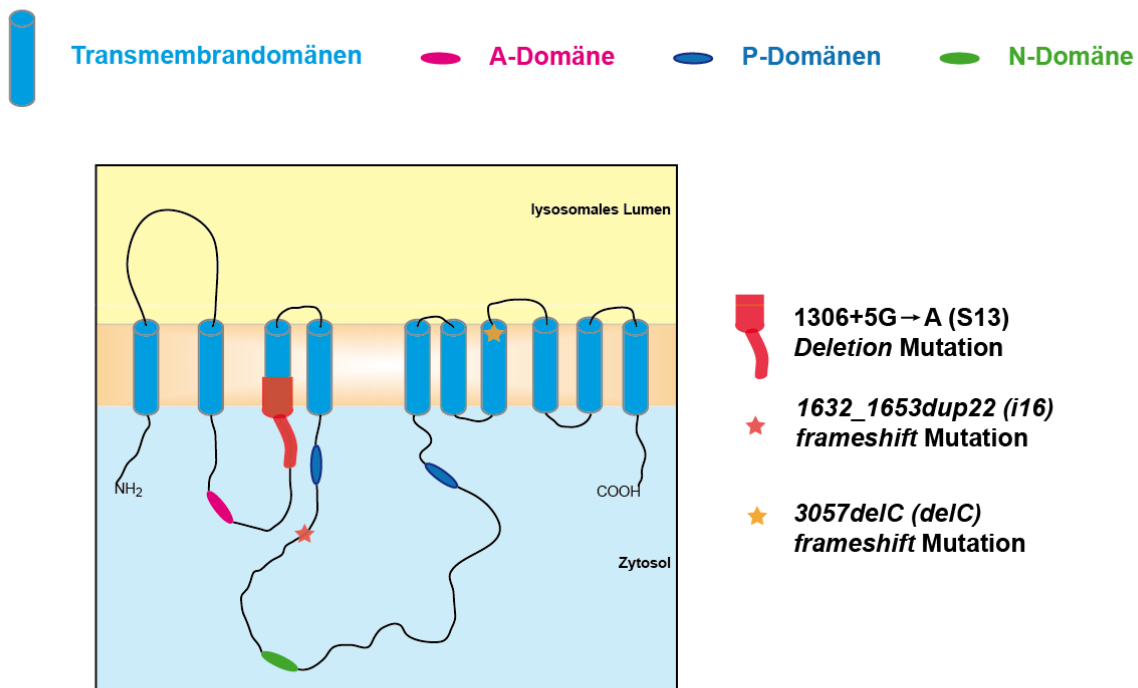


Abbildung 3.1 – Proteinsequenz und Strukturvorhersage für ATP13A2.

Aus der Proteinsequenz von ATP13A2 (Isoform 2) ergeben sich laut Vorhersage zehn Transmembrandomänen (hellblau). Die für die P-Type ATPase-Aktivität wichtigen Domänen A, P und N sind im Protein konserviert und in rosa, blau und grün angegeben. Die KRS-assoziierten Mutationen sind angegeben. Sowohl der N- als auch der C- Terminus sind zytosolisch. Abbildung eigene Darstellung bzw. wurde modifiziert nach Ramirez et al. (2006)

ATP13A2 wird ubiquitär exprimiert, wobei die höchste Expression im Gehirn vorliegt, sowohl im adulten als auch im embryonalen Gehirn. Dies konnte in unterschiedlichen Spezies gezeigt werden (Ramirez et al. (2006), Weingarten et al. (2012), Lopes da Fonseca, T. et al. (2013)). In Patientenproben wurde eine erhöhte Expression von ATP13A2 im Vergleich zu Kontrollen nachgewiesen (Ramirez et al. (2006), Ramonet et al. (2012)). Auf die Funktion und das transportierte Substrat von ATP13A2 ergaben sich erst im Laufe dieser Arbeit Hinweise. Noch ist nicht viel bekannt und einige Funktionen und Substrate dieser ATPase werden teils kontrovers diskutiert. Zuerst liegt bei einem lysosomal lokalisierten Protein natürlich ein Zusammenhang mit der lysosomalen Funktion nahe. Tatsächlich konnte eine massive lysosomale Beeinträchtigung in Patientenfibroblasten nachgewiesen werden. Die Zellen zeigten kaum noch lysosomale Aktivität und dadurch erhöhten Zelltod (Dehay et al. (2012); Usenovic et al. (2012b)). Die ersten zellulären Veränderungen nach einem Verlust von ATP13A2 wurden allerdings auf mitochondrialer Ebene in Form von mitochondrialer Fragmentierung und Veränderungen in ihrer Funktionalität beobachtet (Grünewald et al. (2012); Gusdon et al. (2012)). Die Ursache für die mitochondrialen Veränderungen sahen Gusdon *et al.* in einem gestörtem Abbau von defekten Mitochondrien, also einer Schädigung der Lysosomen durch fehlendes ATP13A2. Eine weitergehende Schädigung der Lysosomen konnten sie allerdings nicht feststellen (Gusdon et al. (2012)).

Weitere Erkenntnisse über mögliche Funktionen von ATP13A2 stammen aus Hefe-Modellen. Die Überexpression des ATP13A2 Orthologs Ypk9 schützte Hefezellen vor α -Synuklein induzierter Toxizität (Gitler et al. (2009)). Ähnliches konnte später auch in primären Neuronen beobachtet werden. Usenovic *et al.* machten α -Synuklein, das nach einem *Knockdown* von ATP13A2 akkumuliert, für den folgenden Zelltod verantwortlich (Usenovic et al. (2012b); Usenovic et al. (2012a)). ATP13A2 oder Ypk9 schützte die Zelle aber nicht nur vor α -Synuklein induziertem Zelltod. Ihm wurden auch protektive Eigenschaften gegen eine Reihe von Schwermetallen zugesprochen (Schmidt et al. (2009); Gitler et al. (2009); Tan et al. (2011); Chesi et al. (2012)). Dabei rückte v.a. Mn^{2+} in den Mittelpunkt des Interesses und wurde als mögliches Substrat von ATP13A2 beschrieben. Neueste Untersuchungen hingegen beschrieben Zn^{2+} als mögliches Substrat von ATP13A2 (Tsunemi and Krainc (2013); Park et al. (2014); Kong et al. (2014)). Auch gegen andere Stressoren, wie oxidativen oder mitochondrialen Stress, zeigte ATP13A2 protektive Wirkung (Ugolino et al. (2011); Covy et al. (2012)).

Genaueren Aufschluss über die Funktion von ATP13A2 könnten Tiermodelle liefern. Ein effizienter *Knockdown* von ATP13A2 im Zebrafisch (*Danio rerio*) führte zu einer 100% Letalität der Embryonen bis Tag 2 nach der Befruchtung. ATP13A2 könnte somit eine Rolle in der embryonalen Entwicklung spielen. Fische mit einem weniger effizienten *Knockdown* überlebten und zeigten morphologische und motorische Defekte (Lopes da Fonseca, T. et al. (2013)). Daten bzgl. einer Charakterisierung der zellulären Effekte im Zebrafisch liegen bislang noch nicht vor. ATP13A2-defiziente Mäuse hingegen zeigten keine embryonale oder fetale Letalität, wuchsen normal und waren fertil. Erst im Alter wiesen die Mäuse motorische Defizite auf, ebenso wie lysosomale Dysfunktion und eine Akkumulation von α -Synuklein (Schultheis et al. (2013)). Die ATP13A2

Knockout-Maus könnte somit ein gutes Modell für weitere Untersuchungen der Funktion von ATP13A2 darstellen.

3.1.2.2 Lysosomen

Da es sich bei ATP13A2 um ein lysosomales Membranprotein handelt, liegt die Annahme nahe, dass ATP13A2 an der Funktionalität der Lysosomen beteiligt ist. Die Hauptfunktion der Lysosomen ist der Abbau extra- und intrazellulären Materials. Dazu steht ihnen eine Vielzahl an Hydrolasen zu Verfügung, die in der sauren Umgebung der Lysosom (etwa pH 5) optimal arbeiten können (Mindell (2012)). Lysosomen sind durch eine Doppel-Membran vom Zytoplasma abgegrenzt, die einen Kontakt des sauren inneren Milieus des Lysosoms mit dem Zytoplasma verhindert (Abb. 3.2). Kommt es zu einer Ruptur der lysosomalen Membran, kann dies Zelltod zur Folge haben (Boya and Kroemer (2008)).

Lysosomen nehmen extrazelluläre Substrate über Endozytose auf und bauen sie ab (Abb. 3.2). Die Aufnahme von intrazellulärem Material bezeichnet man als Autophagie. Autophagie wird in der Zelle durch unterschiedliche Bedingungen, z.B. der Schädigung von Organellen oder Nährstoffmangel, ausgelöst und führt zum Abbau von Proteinaggregaten, oxidierten Lipiden, geschädigten Organellen oder Pathogenen. Die Abbauprodukte werden von der Zelle zum Aufbau neuer zellulärer Komponenten verwendet oder dem Energiekreislauf zugeführt (Settembre et al. (2013)). Autophagie kann in drei hauptsächliche Formen unterschieden werden. Makroautophagie bezeichnet den Abbau eines Teils des Zytoplasmas. Das abzubauen Material wird von einer sich ausbildenden Doppel-Membran umschlossen, bis sich ein spezielles Vesikel, das Autophagosom, ausgebildet hat. Das Autophagosom fusioniert anschließend mit dem Lysosom. Lysosomale Hydrolasen lysieren erst die innere Membran und bauen abschließend den Inhalt des nun geschaffenen Autolysosoms ab (Abb. 3.2). Betrachtet man den Abbau spezifischer Organellen über Makroautophagie, so spricht man z.B. im Zusammenhang mit Mitochondrien von Mitophagie (Abb. 3.5). In einer zweiten Form der Autophagie, der Mikroautophagie, nimmt das Lysosom kleine Mengen Zytoplasma direkt durch Einstülpung seiner Membran auf (Xie and Klionsky (2007)). Unter der dritten Form der Autophagie, der Chaperon-medierten Autophagie (CMA), versteht man den Abbau spezifischer, zytosolischer Proteine. Das Erkennungsmotiv KFERQ, das alle CMA-Substrate enthalten, wird von Chaperonen erkannt und führt zu einer Einschleusung des Proteins über den CMA-Rezeptor *Lysosome-associated membrane protein 2* (LAMP2) ins Lysosom (Orenstein and Cuervo (2010)) (Abb. 3.2).

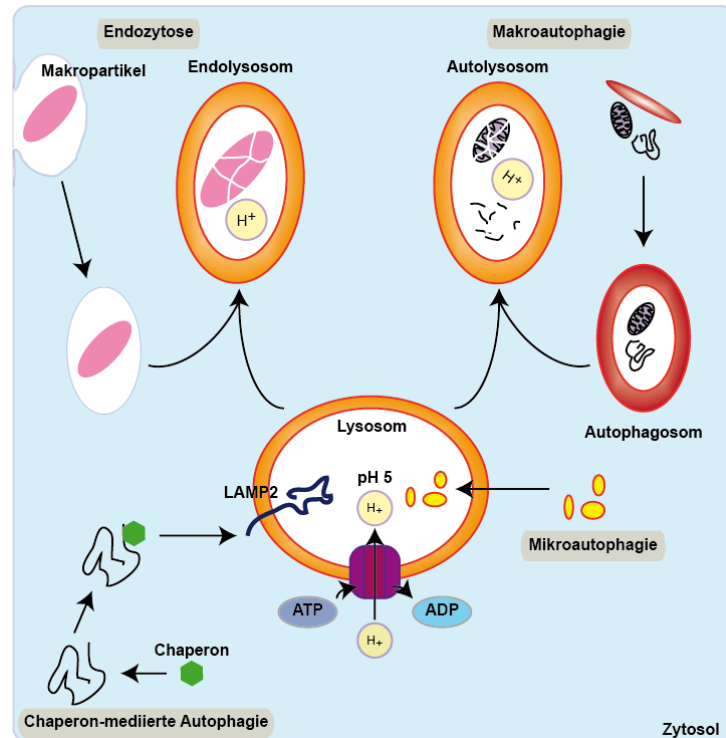


Abbildung 3.2 – Struktur und Hauptabbauewege des Lysosoms.

Das Lysosom ist von einer Doppel-Membran umgeben. Die im Lysosom enthaltenen, für den Abbau der Substrate verantwortlichen Hydrolasen (nicht eingezeichnet) arbeiten im sauren Milieu des Lysosoms optimal. Die Aufrechterhaltung des sauren Milieus über eine Protonenpumpe (V-Typ ATPase) ist ATP-abhängig.

Extrazelluläre Substrate werden über Endozytose aufgenommen. Man unterscheidet die Aufnahme von festen Partikeln (Phagozytose) und gelösten Partikeln (Pinozytose). Nach Einstülpung der Zellmembran bildet sich ein Vesikel aus, das Endosom, das mit dem Lysosom verschmilzt und seinen Inhalt abbaut.

Intrazelluläre Substrate werden hauptsächlich über Autophagie abgebaut. Autophagie kann in drei Formen unterschieden werden. Über Makroautophagie wird Zytoplasma oder ganze zelluläre Organellen abgebaut, wie z.B. Mitochondrien. Die Substrate werden von einer Doppel-Membran umschlossen und so im Autophagosom eingeschlossen. Nach der Fusionierung mit dem Lysosom kommt es zum Abbau der Substrate im Autolysosom. Der Abbau von Substraten der Mikroautophagie erfolgt durch direkte Aufnahme von Zytoplasma in das Lysosom durch Einstülpung der lysosomalen Membran. In der dritten Form, der Chaperon-medierten Autophagie, erkennen Chaperone Signalmotive in den Substraten und medieren ihre Einschleusung in das Lysosom über den CMA-Rezeptor LAMP2. Dort werden sie dann abgebaut.

Die Proteine der lysosomalen Membran erfüllen essentielle Funktionen, wobei v.a. die Ansäuerung des Lysosoms durch einen Protonentransporter (Abb. 3.2) und der Transport anderer Substrate wie Aminosäuren, Kohlenhydrate oder Fettsäuren im Vordergrund stehen. Aber auch die lysosomale Stabilität und Integrität, die Motilität und die Fusion oder Fission mit anderen membranumschlossenen Organellen sind Aufgaben der lysosomalen Membranproteine (Saftig (2005)). Die Aufgabe, die ATP13A2 in diesem Zusammenhang erfüllt, ist bislang nicht genau bekannt. Aus

seiner Familienzugehörigkeit lassen sich aber schon einige Rückschlüsse ziehen.

3.1.2.3 P-Typ ATPasen

Wie bereits erwähnt ist ATP13A2 eine ATPase und gehört der Gruppe der Typ V P-Typ ATPasen an. P-Typ ATPasen sind Ionenpumpen, die Ionen, oft ein- oder zweiwertige Kationen, über Zellmembranen hinweg entgegen eines Konzentrationsgradienten transportieren und so zu vielen lebenswichtigen Prozessen beitragen. Diese Transportprozesse verbrauchen Energie in Form von ATP. P-Typ ATPasen sind eine große und vielfältige Familie von Transmembranproteinen, die in fast allen Geweben und Organismen vorkommen (Chan et al. (2010)). Ihre berühmtesten Vertreter sind z. B. die H^+/K^+ -ATPase im Magen oder die Na^+/K^+ -ATPase, die das Membranpotential der Zellen aufrecht erhält (Kühlbrandt (2004); Palmgren and Nissen (2011)).

Allen P-Typ ATPasen gemein ist die zentrale Asparaginsäure in der Phosphorylierungsdomäne (P-Domäne) DKTGTLT, die reversibel phosphoryliert werden kann und von der die P-Typ ATPasen auch ihren Namen haben. Des Weiteren weisen P-Typ ATPasen zehn hydrophobe Membrandomänen auf, sowie konservierte, zytoplasmatische Domänen zwischen den beiden Membrandomänen 2 und 3 sowie 4 und 5. Der N- bzw. C-Terminus sind zytoplasmatisch. Die molekulare Masse liegt meist zwischen 70-150 kDa. All diese Kennzeichen treffen auch auf ATP13A2 zu, weshalb es sich um einen klassischen Vertreter der P-Typ ATPasen handelt (Abb. 3.1)(Kühlbrandt (2004); Palmgren and Nissen (2011)).

3.1.2.3.1 Typ V P-Typ ATPasen

Auf Grund von Sequenzhomologien können P-Typ ATPasen in fünf Gruppen unterteilt werden, Typ I-V. ATP13A2 gehört zu den Typ V P-Typ ATPasen. Über Gruppe I-IV sind viele Details bekannt, so z. B. Aufbau und Substrate einiger ATPasen. Über Gruppe V hingegen ist sehr wenig bekannt.

Sie stellen eine separate Klasse dar, die nur in Eukaryoten vertreten ist. Ihre Substratspezifität und biologische Rolle ist nicht genauer bekannt, es wird aber angenommen, dass auch sie Ionen transportieren (Palmgren and Nissen (2011); Kühlbrandt (2004)). Alle Typ V P-Typ ATPasen weisen ein gemeinsames Strukturelement in der vierten Transmembrandomäne auf, nämlich das Motiv PPXXP, das vermutlich die Ionenbindende Stelle darstellt (Palmgren and Nissen (2011); Sørensen et al. (2010)). Anhand dieses Motivs können die Typ V P-Typ ATPasen in zwei weitere Subgruppen unterschieden werden, die PVA und PVB ATPasen. PVA ATPasen weisen zwei negativ geladene Aminosäuren in diesem Motiv auf, PP(E/D)XPX(E/D), wohingegen PVB ATPasen zwei hydrophobe Aminosäuren enthalten. Mit dem Motiv PPALPAA ist ATP13A2 somit eindeutig ein Vertreter der Typ VB P-Typ ATPasen. Da die beiden Motive eine sehr unterschiedliche elektrische Umgebung aufweisen, könnte dies die Substratspezifität der beiden Gruppen deutlich beeinflussen (Sørensen et al. (2010)).

3.1.2.3.2 Struktur und Funktionsweise von P-Typ ATPasen

Die Struktur und Funktionsweise von P-Typ ATPasen ist auf Grund der großen Homologien innerhalb dieser Familie für alle ATPasen vergleichbar. Daher können die Erkenntnisse, die man aus der Kristallisation der Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) gewonnen hat, auf andere ATPasen übertragen werden (Abb. 3.3A) (Toyoshima et al. (2000)). P-Typ ATPasen besitzen vier wichtige Strukturelemente. Das zentrale Element ist dabei die Phosphorylierungsdomäne (P-Domäne). Sie bildet den katalytischen Kern und ist das am stärksten konservierte Motiv mit der Sequenz DKTGTLLT. Die enthaltene Asparaginsäure (D) wird während der ATP-Hydrolyse phosphoryliert und stellt somit den energetischen Ablauf sicher. Die Nukleotidbindedomäne (N-Domäne) liegt als großes Teilstück der P-Domäne vor. Die Aktuatordomäne (A-Domäne) enthält das konservierte Motiv TGE (Abb. 3.3A/B). Das letzte Motiv stellen die zehn Transmembrandomänen dar (Palmgren and Nissen (2011); Kühlbrandt (2004)). Alle vier Strukturelemente sind für eine korrekte Funktion der P-Typ ATPasen unerlässlich.

Durch Konformationsänderung der ATPase gelangen die Ionen von einer Seite der Membran auf die andere. Ausgangspunkt bildet dabei der Zustand E1 der ATPase. Das Ion X^+ aus dem Zytoplasma gelangt über einen Kanal an die Ionenbindende Stelle in der Membrandomäne und bindet. Parallel bindet die N-Domäne ein ATP-Mg^{2+} Molekül. Durch eine Konformationsänderung wechselt die ATPase in den E1-P Status, wobei sich der Kanal schließt und das X^+ gefangen ist. Durch die entstandene Nähe des ATP-Mg^{2+} -Moleküls zur P-Domäne kommt es zur Übertragung des Phosphats auf die Asparaginsäure des DKTGTLLT Motivs und somit zur Hydrolyse des ATP und zur Energiegewinnung, was durch das Mg^{2+} -Ion und die besetzten Ionen-Bindestellen unterstützt wird. Die Rotation der A-Domäne löst den Übergang in den E2-P Status aus. Dabei wird ADP freigesetzt und die Affinität der X^+ -Bindestelle geht verloren, das Ion wird auf der gegenüberliegenden Membranseite freigesetzt. So wird die Bindestelle für das Ion Y^+ frei und durch dieses auch besetzt. In einem abschließenden Schritt wird die Phosphatgruppe von der Asparaginsäure hydrolysiert, wodurch der E2-Zustand erreicht wird. Durch die Dissoziation des Phosphatrests kommt es zu einer Konformationsänderung hin zur Ausgangssituation E1, so dass das Ion Y^+ die Pore verlassen kann und die Bindestelle wieder frei für ein neues Ion X^+ ist. Der Zyklus kann nun von neuem durchlaufen werden (Abb. 3.3B) (Kühlbrandt (2004); Palmgren and Nissen (2011)).

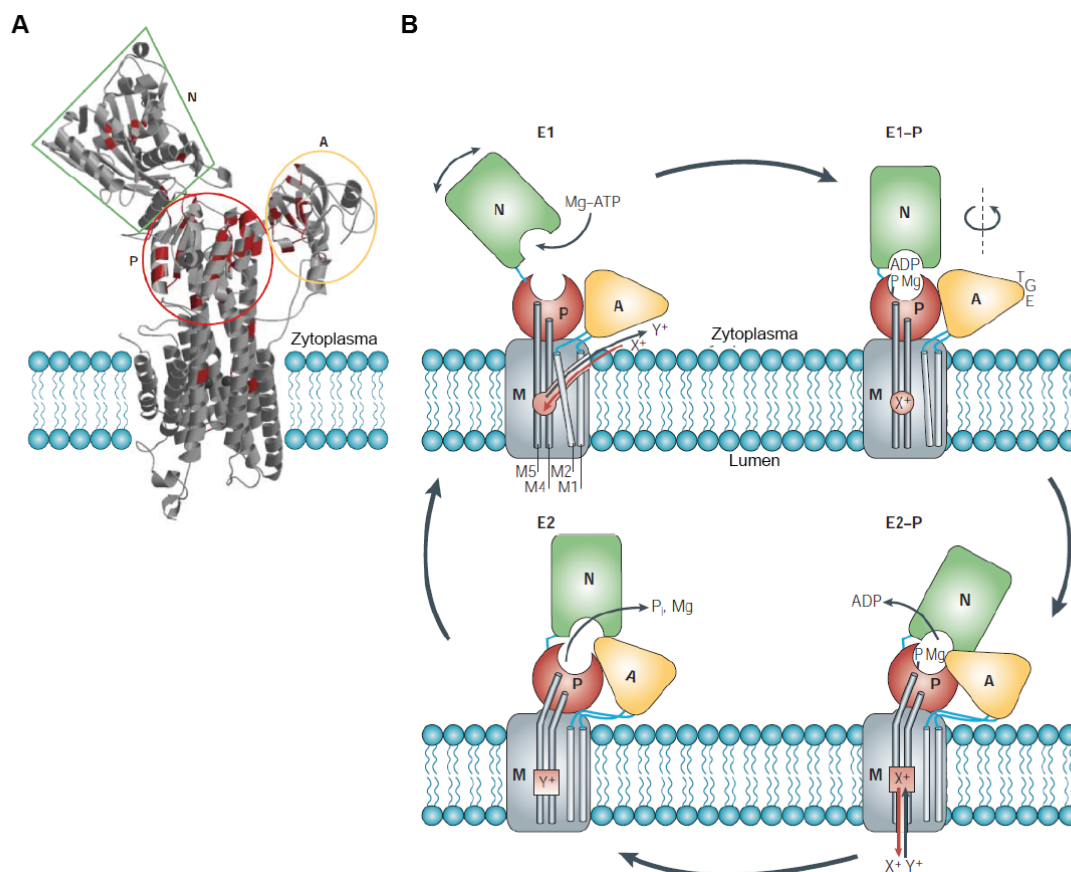


Abbildung 3.3 – Struktur und Funktionsweise von P-Typ ATPasen.

A) Struktur der Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA), die als Modell für die gesamte Klasse der P-Typ ATPasen angesehen werden kann. Die Strukturelemente N-, P- und A-Domäne, sowie die Membrandomänen sind hochkonserviert. B) Schematische Darstellung der Funktionsweise von P-Typ ATPasen. Die Domänen durchlaufen in diesem katalytischen Kreislauf eine Konformationsänderung, die zum Transport der Ionen über die Membran hinweg führt. Die Energie für diesen Prozess wird aus der Hydrolyse von ATP gewonnen. Abbildung wurde modifiziert nach Kühlbrandt (2004).

3.2 ATP13A2 und Morbus Parkinson

Die *ATP13A2* Mutationen delC, S13 und i16 sind mit dem Kufor-Rakeb-Syndrom assoziiert, welches ein Parkinson+-Syndrom darstellt. Das bedeutet, dass die Patienten über die klassischen Parkinsonismus-Symptome hinaus noch an weiteren Symptomen leiden. Im Laufe der Zeit konnten aber auch *ATP13A2* Mutationen in Morbus Parkinson Patienten entdeckt werden. Daher wird *ATP13A2* als monogenetische Ursache für Morbus Parkinson angesehen. *ATP13A2* ist auch als PARK9 Locus bekannt. Seit seiner Beschreibung 2006 wurden zahlreiche Mutationen beschrieben, die mit einem Ausbruch von Morbus Parkinson in einem recht jungen Alter (<50 Jahre) assoziiert sind und heterozygot vorliegen. Ihre Assoziation mit Morbus Parkinson ist allerdings nicht in allen Fällen endgültig gesichert. So herrscht z.B. über das pathogene Potential der c.2236G>A Mutation Uneinigkeit (Lin et al. (2008); Fei et al. (2010); Chan et al. (2010)):

Tabelle 3.3 – Mutationen, die im Zusammenhang mit Morbus Parkinson beschrieben wurden.

Aminosäurewechsel	Basenwechsel	Zygotität	Herkunft	Referenz
Thr12Met	C35T	heterozygot	Italien	Di Fonzo et al. (2007)
Gly533Arg	G1597A	heterozygot	Italien	Di Fonzo et al. (2007)
Ala249Val	c.746C>T	heterozygot	Europa	Djarmati et al. (2009)
Scr282Cys	c.844A>T	heterozygot	Europa	Djarmati et al. (2009)
Ile946Phe	c.2836A>T	heterozygot	Europa	Djarmati et al. (2009)
Arg980His	c.2939G>A	heterozygot	Europa	Djarmati et al. (2009)
Arg294Gln	c.881G>A	heterozygot	Europa	Djarmati et al. (2009)
Arg449Gln	c.1346G>A	heterozygot	Europa	Djarmati et al. (2009)
G1014S	c.XXX G>A	heterozygot	Taiwan	Chen et al. (2011)
Arg370fs	c.1108_1120del13	heterozygot	Litauen	Fong et al. (2011)
Ala746Thr	c.2236G>A	heterozygot	Asien	Lin et al. (2008), Fei et al. (2010), Chan et al. (2010)

ATP13A2 kann eindeutig mit Parkinsonismus in Verbindung gebracht werden. Unter Parkinsonismus versteht man das Auftreten Parkinson-artiger Symptomatik, wobei dem überwiegenden Teil der Parkinsonismus-Erkrankungen ein idiopathischer Morbus Parkinson zu Grunde liegt. Weitere Formen von Parkinsonismus können z.B. Parkinson+-Syndrome wie KRS sein, oder ein durch Medikamente ausgelöster Parkinsonismus. Symptome und Pathogenese sind dem Morbus Parkinson aber sehr ähnlich, weswegen eine genauere Betrachtung des Morbus Parkinson viele Rückschlüsse auch auf Parkinsonismus-Erkrankungen zulässt.

3.2.1 Morbus Parkinson

3.2.1.1 Symptome und Diagnose

Das erste Mal beschrieben wurden die Symptome des Morbus Parkinson bereits 1817 von dem Arzt und Pharmazeuten James Parkinson in seiner Abhandlung *An Essay on the Shaking Palsy*. Er beschrieb Patienten, die einen Ruhetremor, eine gebeugte Haltung und eine deutlich verlang-

samte Gangart aufwiesen. Er nannte diese Krankheit Schüttellähmung (*Shaking Palsy = Paralysis Agitans*) (Parkinson (2002)). Damit hatte er bereits vor 200 Jahren drei der vier Kardinalsymptome der Krankheit beschrieben, die man heute unter Morbus Parkinson kennt: der Ruhetremor, eine Brady- bis hin zu Akinese, posturale Instabilität sowie Rigor. Darüber hinaus können weitere Symptome wie z. B. Blutdruckänderungen, Geruchsstörungen, Schlafstörungen, Blasenfunktionsstörungen, aber auch psychische Störungen oder Demenz auftreten (Lees et al. (2009); Massano and Bhatia (2012)).

Da bis heute keine eindeutigen Biomarker für Morbus Parkinson vorhanden sind, verläuft die Diagnose über klinische Kriterien, wie sie von der *Brain Bank of the Parkinsons Disease Society in the United Kingdom* definiert worden sind. Bradykinesie sowie ein weiteres der Kardinalsymptome der Krankheit müssen vorliegen. Zusätzlich muss auf einige Ausschlusskriterien sowie Sekundärsymptome hin untersucht werden (Hughes et al. (1992); Hardy et al. (2003)). Eine exakte Diagnose kann aber vor allem in den Frühstadien der Krankheit schwierig sein und eine definitive Diagnose erst *post-mortem* erfolgen (Massano and Bhatia (2012); Albanese (2003)).

3.2.1.2 Ätiologie

Morbus Parkinson ist eine altersbedingte Krankheit. In Industriestaaten sind etwa 0,3% der Bevölkerung erkrankt, wobei es bei den über 60 Jährigen bereits 1%, bei den über 80 Jährigen sogar 3% sind (Massano and Bhatia (2012)). Das durchschnittliche Alter bei Beginn der Krankheit beträgt 55 Jahre (Dauer and Przedborski (2003)). Somit ist Morbus Parkinson die häufigste Bewegungsstörung und die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach Morbus Alzheimer. Die Zahl der Erkrankten über 50 Jahren weltweit wird sich in den nächsten 15 Jahren von etwa 4,1 Million (2005) auf etwa 8,7 Millionen (2030) verdoppeln. Vor allem in den Schwellenländern wird sich die Zahl der Erkrankten enorm erhöhen (Dorsey et al. (2007)).

3.2.1.3 Neuropathologie und Therapie

Erst 1960 konnte der biochemische Hintergrund der Krankheit genauer aufgeschlüsselt werden (Ehringer and Hornykiewicz). Der Verlust dopaminerger Neuronen in der *Substantia nigra pars compacta* bedingt die motorischen Defizite. Durch das fehlende Dopamin erfolgt eine Dysregulation der Basalganglien in Folge dessen es zum Verlust der Kontrolle über die willkürlichen Bewegungen kommt. Erste Symptome werden erst sichtbar, wenn bereits 50-70% der dopaminerger Neuronen abgestorben sind (Lesage and Brice (2009)). Der neuronale Verlust beschränkt sich aber nicht nur auf dopaminerge Neuronen, sondern betrifft auch noradrenerge, serotonerge und cholinerge Neuronen, ebenso wie den zerebralen Cortex, den *Bulbus Olfactoris* und das autonome Nervensystem. Außerdem können auch hippocampale Strukturen betroffen sein. Diese Verluste erklären einige der Begleitsymptome des Morbus Parkinson (Dauer and Przedborski (2003)). Der Verlust der dopaminergen Neuronen wird durch die Depigmentierung der *Substantia nigra pars compacta* sichtbar. Ein weiteres sichtbares Zeichen des Morbus Parkinson sind kleine Einschlusskörperchen in den Neuronen, die sogenannten Lewy Körperchen. Lewy Körperchen sind allerdings

kein alleiniges Merkmal des Morbus Parkinson. So treten Lewy Körperchen z.B. auch in der *Lewy Body* Demenz auf. Manchmal weisen Patienten mit sehr starkem Plaque-Vorkommen aber auch keine neurologischen Symptome auf (Lees and Singleton (2007)). In den Lewy Körperchen ist eine Vielzahl von Proteinen eingeschlossen, v.a. aber α -Synuklein und Ubiquitin (Spillantini et al. (1997)). Die genaue Rolle und Funktion der Lewy Körperchen ist bislang nicht geklärt.

Der Verlust dopaminerger Neuronen kann bis heute medikamentös nicht aufgehalten oder geheilt werden. Daher konzentrieren sich die Therapien auf einen Ersatz des fehlenden Dopamins. An erster Stelle steht dabei die Therapie mit Levodopa (L-Dopa) in Kombination mit Decarboxylase-Hemmern. Die Decarboxylase-Hemmer inhibieren die Metabolisierung des L-Dopas bereits in der Peripherie und stellen einen Transport über die Blut-Hirn-Schranke ins Hirn sicher. Hier wird L-Dopa dann decarboxyliert und kann als Dopamin wirken. Diese Therapie führt schnell zu einer Verbesserung der Symptome. Ihre Wirkung lässt allerdings nach einigen Jahren nach und es kommt zum sogenannten *On-Off*-Phänomen, in dem die Bewegungen der Patienten teils sehr eingeschränkt oder kaum zu kontrollieren sind. Darüber hinaus werden Dopamin-Agonisten angewendet, außerdem Monoaminoxidase-Inhibitoren sowie Catechol-O-Methyltransferase-Inhibitoren und NMDA-Antagonisten verabreicht. Zusätzlich steht eine operative Methode durch die Tiefenhirnstimulation zur Verfügung (Aktories et al. (2005)).

3.2.1.4 Ursachen

Die genauen Ursachen, die zu einem Verlust der dopaminerger Neuronen führen und somit zum Morbus Parkinson, sind bis heute nicht geklärt. Eine bessere Aufklärung der Mechanismen und der betroffenen zellulären Signalwege könnte zu einer Entwicklung von ursächlich wirksamen Medikamenten führen. Zahlreiche Umweltfaktoren werden als Ursache des Morbus Parkinson diskutiert. Immer wieder stehen Pestizide und Schwermetalle im Fokus verschiedener Studien. Ein Zusammenhang konnte aber noch nicht eindeutig belegt werden (Lai et al. (2002); Betarbet et al. (2000)). Rauchen wird eine protektive Wirkung zugeschrieben (Grandinetti et al. (1994); Lau and Breteler (2006)), aber auch dies ist nicht eindeutig belegt.

In der Ursachenforschung des Morbus Parkinson hilft die Untersuchung von verschiedenen Parkinsonismus-Fällen weiter. So können Rückschlüsse auch auf die Ursachen des Morbus Parkinson gewonnen werden. Als sicher gilt, dass einige Medikamente, z. B. Neuroleptika, die den Dopamin-Rezeptor blockieren, Parkinsonismus auslösen können (Bondon-Guitton et al. (2011)). Auch die Wirkung von 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,5,6-Tetrahydropyridin (MPTP) ist bestätigt. 1982 entwickelten junge Drogenabhängige einen sehr schweren und schnell fortschreitenden Parkinsonismus nach dem Konsum von Meperidin, das mit MPTP verunreinigt war (Langston et al. (1983)). MPTP ist lipophil und kann so gut die Blut-Hirn-Schranke passieren. Im Hirn wird MPTP in MPP⁺ umgewandelt und über den Dopamin-Rezeptor in dopaminerge Neuronen transportiert. Dort entfaltet es seine toxische Wirkung durch Inhibition von Komplex I der Atmungskette in den Mitochondrien (Markey et al. (1984); Exner et al. (2012); Pils and Winklhofer (2012)) und

führt zu dopaminerger Neurodegeneration (Dauer and Przedborski (2003)).

Ein Meilenstein in der Ursachenforschung des Parkinsonismus stellte die Entdeckung familiärer, genetisch bedingter Parkinsonismus-Fälle dar. Etwa 10% der Parkinsonismus-Fälle weisen eine genetische Ursache auf (Dauer and Przedborski (2003)). 2006 stellte das bereits beschriebene ATP13A2 das bislang letzte Gen dar, das als monogenetische Ursache von Parkinsonismus bestätigt werden konnte. Als erstes Gen wurde 1997 α -Synuklein ursächlich für Parkinsonismus entdeckt (Polymeropoulos (1997)).

3.2.2 Mit Parkinsonismus assoziierte Gene

Seither konnten große Fortschritte in der Entdeckung und Erforschung der für Parkinsonismus verantwortlichen Gene erzielt werden. Für folgende Gene liegt eine Bestätigung als monogenetische Ursache für Parkinsonismus vor:

Tabelle 3.5 – PARK-*Loci* und Vererbungsgang der mit Parkinsonismus assoziierten Gene.

Lokus	Gen	Chromosom	Vererbung	Originalpublikation
Park1 & 4	α - <i>Synuklein</i>	4q21	autosomal dominant	Polymeropoulos (1997); Singleton et al. (2003)
Park2	<i>Parkin</i>	6q25-27	autosomal rezessiv	Kitada et al. (1998)
Park6	<i>PINK1</i>	1p35-36	autosomal rezessiv	Valente (2004)
Park7	<i>DJ-1</i>	1p36	autosomal rezessiv	Bonifati (2002)
Park8	<i>LRRK2</i>	12p11	autosomal dominant	Paisán-Ruíz et al. (2004); Zimprich et al. (2004)
Park9	<i>ATP13A2</i>	1p36	autosomal rezessiv	Ramirez et al. (2006)

All diese Gene sind Ursachen für familiär vererbten Parkinsonismus, dessen Symptome und Pathologien sich teils etwas vom klassischen Morbus Parkinson unterscheiden. Nichtsdestotrotz zeigen sich sehr interessante Überlappungen zwischen genetisch bedingten und idiopathischen Parkinsonfällen. Die Erforschung der genetisch bedingten Parkinsonismus-Fälle bietet somit einen guten Einblick in Signalwege, die auch bei Morbus Parkinson betroffen sein könnten. So stellt α -Synuklein eine der Hauptkomponenten der Lewy-Körperchen dar, die eines der pathologischen

Kennzeichen des Morbus Parkinson sind (Spillantini et al. (1997)). Darüber hinaus konnten Mutationen im *Parkin*-Gen auch in idiopathischen Morbus Parkinson-Fällen festgestellt werden (Hardy et al. (2003)). Ebenso konnte durch oxidativen Stress modifiziertes und fehlgefaltetes Parkin in Gehirnen von Morbus Parkinson-Patienten identifiziert werden. Die in vererbten Fällen gefundenen *Parkin* Mutationen führen ebenfalls zur Misfaltung und Ablagerung von Parkin, was die Zusammenhänge zwischen sporadischen und vererbten Parkinsonismus Fällen unterstreicht (Henn et al. (2005); Exner et al. (2012)). Die Erforschung der einzelnen mit Parkinsonismus assoziierten Gene ist also deswegen so wichtig, da man daraus ein Verständnis für die im Morbus Parkinson betroffenen Signalwege entwickeln kann. In der Folge können sich neue Behandlungs- und Therapieformen entwickeln, die in Zukunft vielleicht zu einer ursächlichen Heilung des Morbus Parkinson führen.

3.2.2.1 Autosomal dominant vererbte Gene

α -Synuklein

Die Entdeckung von α -Synuklein ermöglichte erste Einblicke in molekulare Ursachen von Parkinsonismus. Neben den drei krankheitsassoziierten Mutationen A53T (Polymeropoulos (1997)), A30P (?) und E46K (Zarranz et al. (2004)), führen auch Duplikationen oder Triplikationen (Singleton et al. (2003)) des Gens zu Parkinsonismus. Die Menge von α -Synuklein, die durch die Duplikationen oder Triplikationen entsteht, korreliert dabei mit der Schwere der Krankheit und dem Alter, in dem die Krankheit ausbricht (Hardy et al. (2009)). α -Synuklein ist mit 140 Aminosäuren ein relativ kleines Protein. Es weist in wässriger Lösung keine in sich geordnete Struktur auf, besitzt aber strukturelle Flexibilität, so dass es z. B. bei Kontakt mit Membranen Strukturen ausbilden kann (Bartels et al. (2010); Exner et al. (2012)). Die exakte Funktion von α -Synuklein ist bis heute nicht bekannt. Es vermag an Vesikel in synaptischen Enden zu binden, was eine Rolle im vesikulären Transport und der synaptischen Plastizität nahelegt. So führt eine leichte Überexpression von α -Synuklein zu einer verminderten Ausschüttung von Neurotransmittern (Exner et al. (2012); Yang et al. (2009)). Außerdem bindet α -Synuklein sehr effizient an Membranen. Kamp *et al.* konnten zeigen, dass α -Synuklein die Fusion von Membranen verhindern kann (Kamp et al. (2010); Kamp and Beyer (2006); Exner et al. (2012)).

Leucin-rich-repeat-Kinase 2 = LRRK2

LRRK2 ist im Gegensatz zu α -Synuklein ein großes Multidomänenprotein. Seine Struktur mit einer GTPase- und einer Kinase-Domäne legt eine Funktion als Signal- und Gerüstprotein nahe. Es ist für die Mehrzahl der familiären Parkinsonismus-Fälle verantwortlich. Zahlreiche Mutationen wurden in den unterschiedlichen Domänen des Proteins identifiziert. Eine Mutation in der Kinase-Domäne führt zu einem toxischen Zugewinn der Kinase-Aktivität. Zahlreiche sehr unterschiedliche zelluläre Signalwege werden durch Mutationen in LRRK2 beeinflusst (Exner et al. (2012); Hardy et al. (2009); Yang et al. (2009)).

3.2.2.2 Autosomal rezessiv vererbte Gene

Die autosomal rezessiv vererbten Gene lösen Parkinsonismus mit einem frühen Krankheitsbeginn aus. Alle bisher bekannten Mutationen in diesen Genen führen zu einem Verlust der Funktion der entstehenden Proteine.

Parkin

Mutationen in Parkin sind der häufigste Grund für autosomal rezessiv vererbten Parkinsonismus, wobei bisher zahlreiche Mutationen beschrieben sind. Diese Krankheitsfälle zeichnen sich durch frühen Krankheitsbeginn, einer sehr guten Ansprache auf L-Dopa-Therapie und die Abwesenheit von Lewy-Körperchen aus. Parkin kodiert eine 465 Aminosäure große E3-Ubiquitin-Ligase, bestehend aus einer *ubiquitin-like* Domäne (UBL), einer *in-between RING* Domäne (IBR) und drei *really interesting new gene* Domänen (RING) (Winklhofer (2014)). Viele Mutationen im *Parkin*-Gen führen zur Aggregation des Proteins, wodurch es seine Funktion als E3-Ligase nicht mehr ausführen kann (Henn et al. (2005)). Zahlreiche Substrate für die Ubiquitinierung durch Parkin sind bisher beschrieben, allerdings lässt sich aus diesen kein allgemeiner Funktionsmechanismus ableiten. Bisher zeigt Parkin vor allem eine zellprotektive Wirkung gegen unterschiedliche zelluläre Stressoren und einen klaren Einfluss auf mitochondriale Morphologie und Qualitätskontrolle (Exner et al. (2012); Hardy et al. (2009); Yang et al. (2009)). Interessanterweise zeigen sich Verbindungen zu den anderen autosomal rezessiv vererbten Genen.

PTEN-induced putative kinase 1 = PINK1

Eine solche Verbindung besteht zu PINK1. Das 581 Aminosäure große Protein sitzt in der mitochondrialen Membran und agiert dort als Serin/Threonin-Kinase. Die zahlreich beschriebenen Mutationen beeinträchtigen vor allem die Kinase-Aktivität und die Stabilität des Proteins. Auch PINK1 weist wie Parkin stress-protektives Potential auf und beeinflusst die mitochondriale Morphologie und Qualitätskontrolle. Der Verlust von PINK1 führt zu erhöhter Stressanfälligkeit der Zellen und mitochondrialen Veränderungen in Tiermodellen. Dieser Phänotyp kann interessanterweise durch Parkin und DJ-1 revertiert werden. Dieser Umstand legt nahe, dass vererbte, Parkinsonismus-assoziierte Gene in einem Netzwerk oder in parallel agierenden Signalwegen funktionieren könnten (Exner et al. (2012); Hardy et al. (2009); Yang et al. (2009)).

DJ-1

Mutationen in *DJ-1* sind nur in 1-2% der Fälle die Ursache für vererbten Parkinsonismus. *DJ-1* kodiert für ein 189 Aminosäuren großes Protein, das sowohl sensitiv als auch protektiv gegenüber oxidativem Stress ist (Taira et al. (2004); Kim et al. (2005)). Auch DJ-1 hat einen Einfluss auf die mitochondriale Morphologie (Exner et al. (2012); Hardy et al. (2009); Yang et al. (2009)).

ATP13A2

ATP13A2 vervollständigt die bisher bestehende Liste der monogenetischen Ursachen von Parkinsonismus. Eine genauere Beschreibung findet sich in Kapitel 3.1.

Alle vererbten mit Parkinsonismus assoziierte Gene führen zu ähnlichen Symptomen, obwohl sie unterschiedliche Proteine kodieren. Für ATP13A2 ist bisher jedoch weder eine genaue Funktion noch ein Pathomechanismus bekannt. Daher könnte die Betrachtung der anderen Gene und die durch sie beeinträchtigten Signalwege erste Ansatzpunkte für ATP13A2 liefern.

3.2.3 Signalwege, die bei Parkinsonismus beeinflusst sind

Lange waren die molekularen Ursachen der Parkinson-Erkrankung unbekannt. Mit der Entdeckung des durch MPTP induzierten Parkinsonismus und der familiären durch α -Synuklein, *DJ-1*, *PINK1* oder *Parkin* ausgelösten Parkinsonismus-Fälle konnten jedoch größere Schritte hin zur Lösung dieser Frage gemacht werden. Zur Zeit werden vor allem mitochondriale Veränderungen und oxidativer Stress, sowie der Abbau misgefalteter Proteine und geschädigter Organellen durch das lysosomale und proteasomale System und das neuroprotektive Potential der vererbten Gene diskutiert (Winklhofer (2014); Pilsel and Winklhofer (2012); Exner et al. (2012)).

3.2.3.1 Parkinsonismus und Mitochondrien

Parkinsonismus, der durch MPTP induziert wird, lieferte erste Einblicke in die molekularen Mechanismen des Parkinsonismus. MPP⁺, der aktive Metabolit von MPTP, inhibiert Komplex I der Atmungskette und stellt damit eine eindeutige Verbindung von Parkinsonismus zu den Mitochondrien dar. Die Hauptaufgabe der Mitochondrien in den Zellen ist die Generierung von ATP über die Atmungskette, also die Energieproduktion. Aber auch in der Regulation der Apoptose und als Kalzium-Speicher spielen Mitochondrien eine wichtige Rolle. Ihrer korrekten Regulation kommt also große Bedeutung zu und eine Dysregulation führt oft zu massiver zellulärer Dysfunktion und Krankheiten. Ein System von Proteasen und Chaperonen kontrolliert und schützt mitochondriale Proteine vor Stress-induzierten Schäden, bzw. baut beschädigte Proteine ab. Durch ständige Fusion und Fission wird versucht, mitochondriale Schäden zu verdünnen. Irreversibel geschädigte Mitochondrien werden hingegen abgebaut (Rugarli and Langer (2012)).

3.2.3.1.1 Inhibition des Komplex I der Atmungskette und oxidativer Stress

Neben MPP⁺ konnten noch andere Chemikalien identifiziert werden, z. B. das Pflanzenschutzmittel Rotenon, die ebenfalls an Komplex I der Atmungskette angreifen. Auch in Patienten konnte eine reduzierte Komplex I-Aktivität festgestellt werden, was für eine tatsächliche Einbindung der Mitochondrien in molekulare Krankheitsmechanismen des Parkinsonismus spricht. Eine Inhibition des Komplex I führt zu verminderter ATP-Produktion und der Generierung oxidativen Stresses, der zu Schädigung mitochondrialer DNA, Komponenten der Atmungskette sowie weiterer mitochondrialer Faktoren führen kann und somit einen Teufelskreis immer neuer Schädigungen und

Generierung weiteren oxidativen Stresses auslöst. Außerdem kann oxidativer Stress zur Aggregation z.B. von Parkin führen, einem neuroprotektiven Protein. Dieses kann durch die Inaktivierung seine protektive Funktion nicht mehr erfüllen. Parkin Aggregate wurden tatsächlich in Autopsie-Proben von Patienten gefunden (Winklhofer (2014)). Die schädliche Rolle oxidativen Stresses im Rahmen von Parkinsonismus konnte durch die Entdeckung von *DJ-1* unterstützt werden. Es konnte gezeigt werden, dass DJ-1 vor Zelltod, ausgelöst durch oxidativen Stress, schützt (Taira et al. (2004); Kim et al. (2005); Park et al. (2005)). Die Erforschung der Parkinsonismus-assoziierten Gene lieferte weitere Erkenntnisse zum Zusammenhang zwischen einer mitochondrialen Schädigung und der Entstehung von Parkinsonismus.

3.2.3.1.2 Mitochondriale Funktion

Mitochondrien liegen als Organell mit doppelter Membran in der Zelle vor, deren Hauptaufgabe die Energieproduktion über die Atmungskette ist. Die Komponenten der Atmungskette sind in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert. Die innere Membran liegt dabei in sehr stark aufgefalteter Form vor, wodurch ihre charakteristische Struktur entsteht, die sogenannten *Cristae*. Im Zusammenspiel mit der äußeren Membran entstehen so zwei Räume, die Matrix und der Intermembranraum, die für die korrekte Funktion der Atmungskette unerlässlich sind (Abb. 3.4A/B). Die Atmungskette produziert während der oxidativen Phosphorylierung reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) und somit oxidativen Stress, der wie bereits beschrieben den ersten Zusammenhang zwischen Mitochondrien und Parkinsonismus lieferte. Die wichtigste Aufgabe der Mitochondrien liegt in der Energieproduktion in Form von ATP. Aber auch weitere Prozesse, wie anabole und katabole Reaktionen, die Biosynthese von Häm und anderen Metaboliten sowie der Aufbau von Eisen-Schwefel-*Cluster* verlaufen unter der Beteiligung von Mitochondrien. Außerdem spielen sie eine Schlüsselrolle im Apoptose-Prozess, in der Entwicklung und im Altern. Für all diese Prozesse ist die Struktur der Mitochondrien entscheidend. Mitochondrien sind hochdynamische Organellen, die ein großes, miteinander verknüpftes Netzwerk innerhalb der Zelle ausbilden, das ständigen Teilungs- und Fusionsprozessen unterliegt. Die Balance zwischen Fusion und Fission reguliert dabei unter anderem die Funktionalität der Mitochondrien. So liegt in metabolisch sehr aktiven Zellen ein großes, fusioniertes Mitochondriennetzwerk vor, wohingegen in ruhenden Zellen eher zahlreiche, heterogenere und kleinere Mitochondrien vorliegen. Darüber hinaus wird mitochondriale Fragmentierung als einer der ersten Schritte der Apoptose angesehen. Beschädigte Mitochondrien, die die an sie gestellten Aufgaben nicht mehr erfüllen können, werden abgebaut (Abb. 3.4B). Die genaue Steuerung der mitochondrialen Struktur ist für die Zelle daher elementar wichtig (Westermann (2010); Detmer and Chan (2007)).

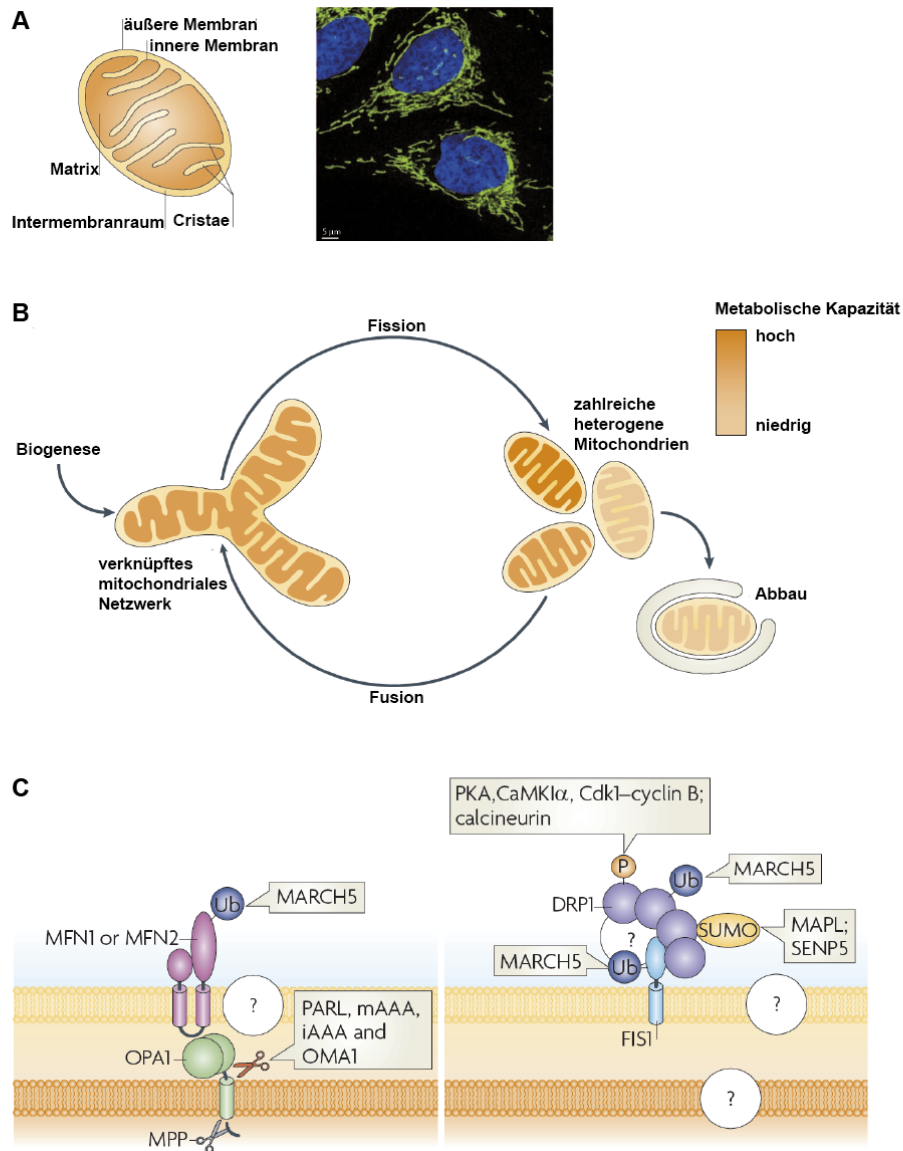


Abbildung 3.4 – Schematische Darstellung der mitochondrialen Dynamik.

A) Schematische Struktur eines Mitochondriums und Mikroskopaufnahme eines intakten mitochondrialen Netzwerks, wie es in der Zelle vorliegt. Die Mitochondrien wurden durch Färbung von TOM 20, einem Protein der äußeren mitochondrialen Membran, sichtbar gemacht. B) Mitochondrien unterliegen fortwährenden Teilungs- und Fusionsprozessen. Das mitochondriale Netzwerk reagiert damit auf die jeweiligen metabolischen Ansprüche der Zelle. Beschädigte Mitochondrien werden abgebaut. C) Die mitochondriale Dynamik ist ein sehr regulierter Prozess. Die Fusionsproteine MFN1/2 und OPA1 und das Fissionsprotein DRP1 steuern die mitochondriale Dynamik. Sie unterliegen einer strengen Regulation. Neben translationaler Kontrolle und Beeinflussung der Bildung der Komplexe spielt auch die post-translationale Kontrolle durch Ubiquitinierung, Sumoylierung und Phosphorylierung sowie unterschiedliche Prozessierung eine große Rolle. Abbildung wurde modifiziert nach Westermann (2010).

3.2.3.1.3 Mitochondriale Dynamik

Durch ständige Fusion und Fission der Mitochondrien wird die Funktionsfähigkeit der Mitochondrien aufrechterhalten. Außerdem kann die Zelle auf veränderte Energieansprüche reagieren. Die Fusion und Fission der Mitochondrien wird hauptsächlich von vier GTPasen kontrolliert. Dabei muss die Fusion bzw. Fission sowohl der äußeren als auch der inneren Membran koordiniert werden. Die Fusion der äußeren Mitochondrienmembran wird von den Mitofusinen (Mitofusion 1 oder 2 = MFN1 oder MFN2) durchgeführt. Die Fusion der inneren Membran wird von *optic atrophy protein 1* (OPA1) übernommen. Die mitochondriale Fission wird hauptsächlich von *dynamitin related protein 1* (DRP1) gesteuert. Die Regulation dieser Prozesse ist dabei entscheidend wichtig und wird von zahlreichen Proteinen ausgeführt. Neben der transkriptionellen Regulation oder der Beeinflussung der Bildung der Fusions- und Fissionskomplexe, spielen vor allem posttranslationale Modifikationen eine große Rolle. *E3 ubiquitin-protein ligase MARCH5* beispielsweise führt zu einer Ubiquitinierung sowohl der Fusionsproteine MFN1/2 als auch des Fissionsproteins DRP1. OPA1 hingegen unterliegt einer unterschiedlichen Prozessierung. OPA1 liegt prinzipiell in acht verschiedenen Isoformen vor, wobei deren Zusammensetzung über den Grad der Fusionierung entscheiden. Eine vermehrte Prozessierung hin zu kurzen Isoformen führt zu weniger Fusion. Die Prozessierung von OPA1 wird von verschiedenen Proteasen übernommen, vor allem von *mitochondrial Presenilins-associated rhomboid-like protein* (PARL), AAA Proteasen und *mitochondrial Metalloendopeptidase OMA1*. Das Fissionsprotein DRP1 wird vor allem über Sumoylierung und Phosphorylierung durch verschiedenste Faktoren reguliert (Abb. 3.4C). Wie wichtig eine korrekte Regulation der Fusion und Fission ist, zeigen zahlreiche Krankheiten, die mit Mutationen in den wichtigen Proteinen verbunden sind. So führen z.B. Mutationen in *OPA1* zu autosomal dominanter optischer Atrophie, oder Mutation in *MFN2* zu Morbus Charcot-Marie-Tooth. Darüber hinaus spielen Veränderungen der mitochondrialen Dynamik auch bei Parkinsonismus eine große Rolle (Westermann (2010); Detmer and Chan (2007); Pils and Winklhofer (2012)).

3.2.3.1.4 Die Beeinflussung der mitochondrialen Dynamik durch Parkinsonismus-assoziierte Gene

Fast alle familiären Parkinsonismus-Gene weisen einen Einfluss auf Mitochondrien auf. So führen erhöhte Mengen von α -Synuklein zu mitochondrialer Fragmentierung, da die Fusion der Mitochondrien durch die Anlagerung α -Synukleins an die Membranen gehemmt wird. Die Funktion der Mitochondrien wird dabei nicht beeinträchtigt, sowohl das Membranpotential als auch die ATP-Synthese sind normal. Die Verkürzung der Mitochondrien kann durch eine Überexpression von Parkin, PINK oder DJ-1 revertiert werden, was für die Idee eines gemeinsamen Wirkungsnetzwerks der familiär vererbten Gene spricht. Umgekehrt führt ein Verlust von α -Synuklein zu einer Elongation der Mitochondrien. Die Fragmentierung oder Elongation der Mitochondrien ist dabei unabhängig von der Fusions-Fissions-Maschinerie der Mitochondrien (Kamp et al. (2010)).

Auch DJ-1 weist einen deutlichen Einfluss auf die Mitochondrien auf, allerdings unter umgekehr-

ten Vorzeichen als bei α -Synuklein. Ein Verlust von DJ-1 führt zu fragmentierten Mitochondrien sowohl in Zellkultur als auch in murinen Neuronen oder Patientenzellen. Damit einher geht ein Funktionsverlust und eine vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoff Spezies (Irrcher et al. (2010)). Interessanterweise sind auch hier PINK1 und Parkin in der Lage, die durch DJ-1 verursachte Mitochondrienveränderung zu revertieren.

Ein Verlust von PINK1 und Parkin hat eine ähnliche Wirkung auf Mitochondrien wie ein Verlust von DJ-1. Ein Verlust von PINK1 führt zu mitochondrialer Fragmentierung, sowohl in kultivierten Zellen als auch in Patientfibroblasten. Dies führt zu funktionalen Einschränkungen, z.B. dem Verlust des Membranpotentials (Exner et al. (2007)). Der Verlust von Parkin hat ähnliche morphologische und funktionelle Auswirkungen: die ATP-Produktion der fragmentierten Mitochondrien ist deutlich erniedrigt. Es konnte gezeigt werden, dass Parkin, wie auch PINK1, im Zellkulturmodell die mitochondriale Fission, gesteuert durch DRP1, unterdrückt (Lutz et al. (2009)). In Tiermodellen konnte ein interessanter Zusammenhang zwischen Parkin und PINK1 bezüglich des mitochondrialen Phänotyps gezeigt werden. *Drosophila* Parkin Null Mutanten weisen eine reduzierte Lebensspanne, motorische Defekte und männliche Sterilität auf, was durch mitochondriale Defekte bedingt ist (Greene et al. (2003)). Einen den Parkin Null Mutanten ähnlichen Phänotypen zeigen PINK1 *loss-of-function* *Drosophila* Mutanten. Dieser konnten durch eine Expression von Parkin deutlich reduziert werden. Umgekehrt ist dies allerdings nicht möglich. Dies lässt den Rückschluss zu, dass Parkin und PINK1 bezüglich der Mitochondrien in einem Signalweg agieren, wobei Parkin PINK1 nachgeschaltet ist (Clark et al. (2006); Park et al. (2006); Yang et al. (2006)). Dieser Zusammenhang konnte auch in Zellkultur nachgewiesen werden. So ist Wildtyp Parkin, nicht aber *loss-of-function* Mutanten, dazu in der Lage, die durch PINK1-induzierte mitochondriale Fragmentierung zu revertieren (Exner et al. (2007)).

Sowohl das dominant vererbte α -Synuklein als auch die rezessiv vererbten Gene DJ-1, PINK1 und Parkin beeinflussen die mitochondriale Dynamik, was einen Zusammenhang zwischen einer mitochondrialen Dysregulation und -funktion und Parkinsonismus nahelegt. Interessanterweise können die auftretenden Effekte teilweise durch die jeweils anderen Gene revertiert werden.

3.2.3.1.5 Mitophagie

In der Fliege konnte bereits ein Zusammenhang zwischen PINK1 und Parkin nachgewiesen werden. Weitere Evidenz dafür, dass beide Gene tatsächlich in einem gemeinsamen Signalweg agieren, konnte von der Arbeitsgruppe von Richard Youle erbracht werden. Narendra *et al.* konnten eine funktionelle Zusammenarbeit von PINK1 und Parkin bei der Beseitigung geschädigter Mitochondrien zeigen. Parkin wird abhängig von PINK1 an beschädigte Mitochondrien rekrutiert und löst damit ihren Abbau über Mitophagie, einer speziellen Form von Autophagie, aus. Carbonyl-Cyanid-3-chlorophenylhydrazon (CCCP) führt zu einer Entkopplung des mitochondrialen Membranpotentials und damit zu einer Beschädigung der Mitochondrien. Werden HeLa-Zellen, die nur sehr geringe Mengen bzw. kein Parkin enthalten (Denison et al. (2003); Pawlyk (2003)), mit

Parkin transfiziert und mit CCCP behandelt, kommt es bereits nach einer Stunde zu einer Rekrutierung von Parkin an die Mitochondrien, nach 24 h sind in diesen Zellen die Mitochondrien abgebaut und Parkin ist wieder zytosolisch verteilt (Narendra et al. (2008)). Für die Rekrutierung von Parkin an die mitochondriale Membran ist das Vorhandensein von Vollängen-PINK1 unerlässlich (Narendra et al. (2010b); Jin et al. (2010)). Das sich nun an der Mitochondrienoberfläche befindliche Parkin ubiquitiniert verschiedenste Proteine, wodurch es zu einem Umbau der Mitochondrienoberfläche kommt (Sarraf et al. (2013)). Verschiedene Adapterproteine, unter anderem *Sequestosome-1* (SQSTM1/p62) (Narendra et al. (2010a); Geisler et al. (2010)), verknüpfen die beschädigten Mitochondrien mit der Autophagie-Maschinerie und es erfolgt nach Verschmelzung des entstandenen Phagophors mit dem Lysosom der Abbau im Autolysosom (Winklhofer (2014)) (Abb. 3.5). Eine Inhibierung des Lysosoms oder des Autophagieprozesses blockt daher auch den Abbau der beschädigten Mitochondrien (Pils and Winklhofer (2012); Narendra et al. (2008)). Mitophagie bestätigt die Zusammenarbeit von PINK1 und Parkin in einem Signalweg. Der gestörte Abbau geschädigter Mitochondrien durch Mutationen in PINK1 oder Parkin und damit eine Schädigung der Zelle insgesamt wäre eine interessante Erklärung für die Pathologien, die in Tiermodellen und in Patienten nachgewiesen werden konnten. Die Umsetzung dieses Konzepts *in vivo* fehlt aber bislang. Gleichwohl untermauert die Beobachtung der Parkin-induzierten Mitophagie die Relevanz der Mitochondrien als pathogene Ursache des Parkinsonismus.

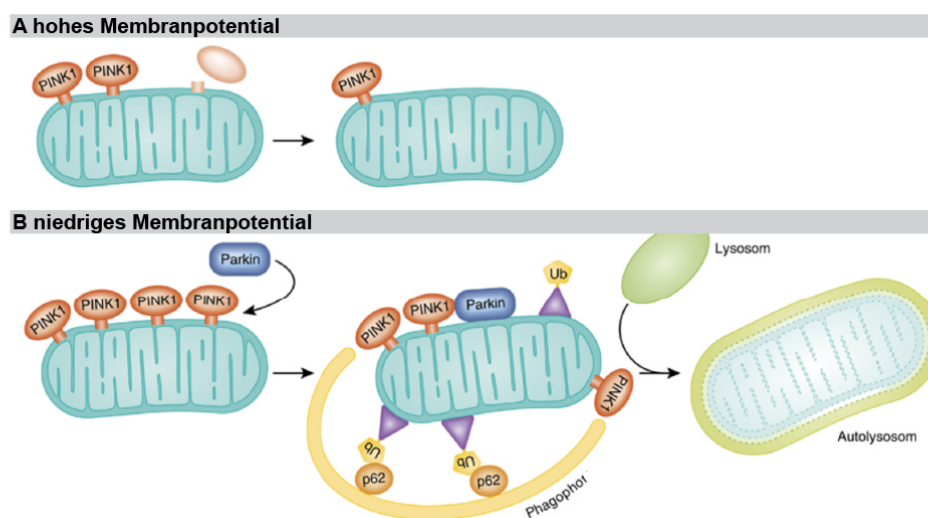


Abbildung 3.5 – Mechanismus der PINK1 und Parkin induzierten Mitophagie.

A) Unter basalen Bedingungen und hohem Membranpotential wird PINK1 an der Oberfläche der Mitochondrien rasch gespalten. Die endogenen PINK1 Mengen sind so sehr gering. B) Nach Entkopplung z.B. durch CCCP und dem Verlust des Membranpotentials unterbleibt die Spaltung von PINK1 und Vollängen-PINK1 akkumuliert auf der Oberfläche der Mitochondrien. Dies ist essentiell für die Translokation von Parkin zu den Mitochondrien, wo es mitochondriale Oberflächenproteine ubiquitiniert. Adapter Proteine wie z.B. p62 verknüpfen anschließend die ubiquitinierten Proteine mit der Autophagie-Maschinerie. Beschädigte, markierte Mitochondrien werden vom Phagophor umschlossen, welches abschließend nach Fusion mit dem Lysosom zum Autolysosom wird und seinen Inhalt verdaut. Abbildung wurde modifiziert nach Exner et al. (2012)

3.2.3.2 Zellprotektion

Neben dem Einfluss auf Mitochondrien zeigen die vererbten Parkinsonismus-Gene noch eine weitere, gemeinsame Eigenschaft - sie sind zellprotektiv und schützen vor Stress-induzierter Apoptose. Da der Untergang der dopaminergen Neurone in der *Substantia nigra pars compacta* die Ursache des Morbus Parkinson darstellt, nimmt der Schutz dieser Neuronen einen hohen Stellenwert ein. Der apoptotische Prozess ist in Neuronen sehr reguliert und eine Dysbalance dieser Regulation stellt oft die Ursache ihres Untergangs dar (Mattson (2000)).

3.2.3.2.1 Apoptose

Apoptose ist genetisch programmierter Zelltod, bei dem einzelne Zellen untergehen, ohne dabei ihre Umgebung in Mitleidenschaft zu ziehen. Dieser Prozess ist sowohl für die Entwicklung, als auch für das zelluläre Gleichgewicht innerhalb verschiedener Gewebe von entscheidender Bedeutung. Das erste Mal beschrieben wurde dieser Prozess bereits 1872 von Carl Vogt im Rahmen seiner Untersuchungen zur Metamorphose der Geburtshelferkröte (Clarke and Clarke (2012)). Der Begriff Apoptose (=altgr.: "fallende Blätter eines Baumes") wurde etwa 100 Jahre später etabliert und die morphologischen Veränderungen während des Apoptose Prozesses von Kerr, Wyllie und Currie (Kerr et al. (1972)) genau beschrieben. Apoptotische Zellen zeichnen sich durch ein Abrunden und Schrumpfen sowie der Abschnürung kleiner apoptotischer Körperchen aus. Der Kern und die DNA der Zelle kondensiert und fragmentiert, ebenso wie viele andere Organellen der Zelle, z.B. das ER, der Golgi-Apparat und das mitochondriale Netzwerk. Auch die Proteine der Zelle werden zersetzt und abgebaut. Die Plasmamembran der Zelle bleibt während des ganzen Prozesses intakt und verhindert so, dass Zellinhalt nach Außen gelangt und eine Antwort des angeborenen Immunsystems auslöst. Der programmierte Zelltod verhindert also eine Entzündungsantwort und wendet damit Schaden von der Umgebung ab. Die abgeschnürten, apoptotischen Körperchen und die restlichen Zellfragmente werden abschließend phagozytiert und abgebaut. Neben ihrer natürlichen Aufgabe in der Entwicklung von Geweben wird Apoptose vor allem durch eine Zellschädigung ausgelöst. Eine Infektion mit einem Virus, eine Schädigung der DNA oder eine Schädigung der Zelle durch Toxine können neben anderen Ursachen Auslöser für Apoptose sein (Taylor et al. (2008)).

Hauptakteure im Abbau der zellulären Strukturen sind *Cys-dependent Aspartyl-specific Proteases* (Caspasen). Caspasen sind Cystein Proteasen, die ihr Substrat nach einem Aspartat schneiden (Riedl and Shi (2004)). Die Aktivierung der Caspasen kann durch einen extrinsischen oder durch einen intrinsischen Weg erfolgen.

Der extrinsische Weg wird durch die Bindung von extrazellulären Liganden wie FasL oder TNF α an ihre Todesrezeptoren ausgelöst. Dies bewirkt eine Autoprozessierung und Aktivierung von Caspase-8, welche wiederum Caspase-3 und auch Caspase-7 aktiviert, was zur Aktivierung weiterer Caspasen und letztendlich zur Proteolyse der Zelle und ihrem Absterben führt.

Der intrinsische Weg hingegen wird z.B. durch DNA-Schäden, ER Stress oder andere toxische Substanzen sowie einem Mangel an Wachstumsfaktoren und Nährstoffen ausgelöst. Es kommt zu einer Aktivierung der *BH3-only* Protein Familie, die die anti-apoptotischen Proteine der *B-cell lymphomy-2* (BCL-2)-Familie inhibieren und die pro-apoptotischen Proteine *BCL-antagonist or killer* (BAK) und *BCL-2-associated X protein* (BAX) aktivieren. BAK und BAX oligomerisieren in der äußeren mitochondrialen Membran und führen zu deren Permeabilisierung. So können Proteine wie Cytochrom C und viele weitere aus dem Intermembranraum ins Zytoplasma ausströmen. Cytochrom C löst die Assemblierung des Apoptosoms aus Cytochrom C und *Apoptotic Protease Activating Factor-1* (APAF1) aus, wodurch Caspase-9 aktiviert wird. Diese aktiviert wiederum die Caspasen-3 und 7, so dass es wie schon beim extrinsischen Aktivierungsweg zur Aktivierung weiterer Caspasen und letztendlich zur Proteolyse der Zelle und ihrem Absterben kommt.

Über das *BH3-only* Protein *BH3-interacting domain death agonist* (BID) ist eine Verknüpfung des extrinsischen und intrinsischen Weges möglich. Caspase-8 schneidet BID und geschnittenes BID löst die BAK/BAX vermittelte Freisetzung von Cytochrom C und seine Folgen aus (Abb. 3.6) (Riedl and Salvesen (2007); Taylor et al. (2008); Youle and Strasser (2008); Tait and Green (2010); Ow et al. (2008)).

Der Apoptose gegenübergestellt sind zahlreiche Überlebens-Signalwege, die über eine Inhibition der Apoptose ein Überleben der Zelle garantieren sollen. Beispiele hierfür sind der *Alternatively Protein Kinase B* (Akt/PKB), *Januskinase-Signal Transducers and Activators Transcription* (JNK-STAT) oder *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) Signalweg. Meist führen sie zu einer Aktivierung wachstumsfördernder oder anti-apoptotischer Proteine.

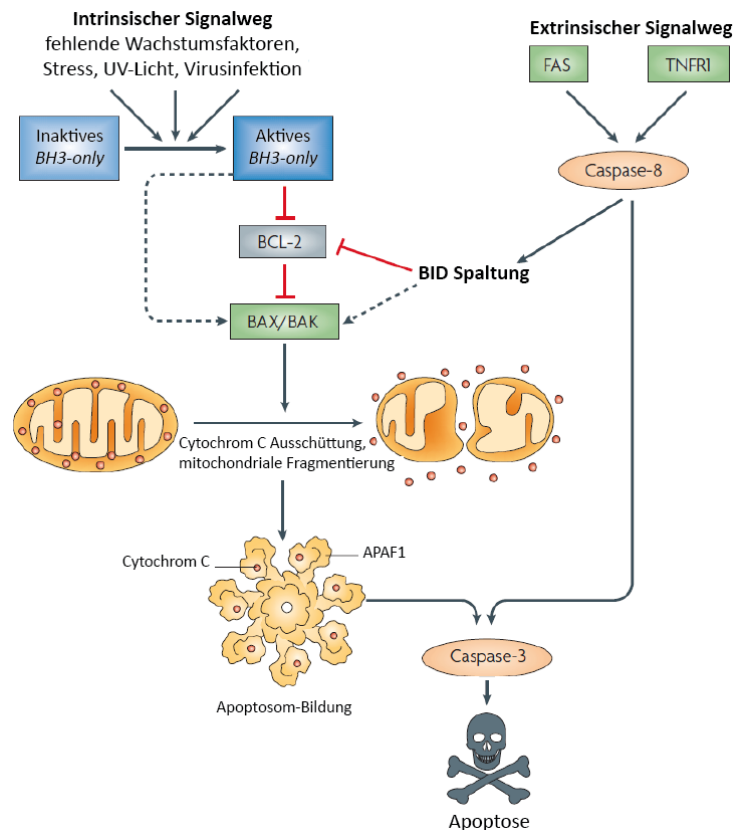


Abbildung 3.6 – Schematische Darstellung des intrinsischen und extrinsischen Signalwegs der Apoptose.

Der extrinsische Signalweg wird durch die Aktivierung der Todesrezeptoren, z.B. FAS oder TNFR1, durch ihre Liganden ausgelöst. Dies führt zu einer Aktivierung von Caspase-8, welche seinerseits die Caspasen-3 und 7 aktiviert. Dadurch wird die Aktivierung weiterer Caspasen induziert und die Zellen werden apoptotisch.

Der intrinsische Aktivierungsweg wird durch unterschiedliche Stressoren ausgelöst. *BH3-only* Proteine werden aktiviert, die zu einer Inhibition von anti-apoptotischen BCL-2 Proteinen und einer Aktivierung von pro-apoptotischem BAK und BAX führen. BAK-BAX Oligomere permeabilisieren die äußere mitochondriale Membran und es kommt zur Ausschüttung von Cytochrom C in das Zytoplasma. Dort kommt es zur Assemblierung des Apoptosoms aus Cytochrom C, APAF1 und Caspase-9, was die Aktivierung weiterer Effektor-Caspasen auslöst und die Zelle apoptotisch werden lässt. Der extrinsische und intrinsische Signalweg sind über das *BH3-only* Protein BID verknüpft. Die Spaltung des Proteins nach Aktivierung des extrinsischen Wegs führt zu einer Auslösung der intrinsischen Kaskade koordiniert über das Mitochondrium. Abbildung wurde modifiziert nach Youle and Strasser (2008)

3.2.3.2.2 Zellprotektive Kapazitäten Parkinsonismus-assoziiierter Gene

Die rezessiv vererbten Parkinsonismus Gene weisen einen Einfluss auf die Apoptose-Kaskade auf, allerdings greifen sie an unterschiedlichen Stellen ein. Erhöhte Mengen der Proteine sind zellprotektiv, wohingegen ein Verlust der Gene zu erhöhter Stressanfälligkeit der Zellen und erhöhten Apoptose-Raten führt.

DJ-1 als Redoxsensor schützt Zellen und Neuronen vor Zelltod ausgelöst durch oxidativen Stress durch Reduktion des Zelltod-auslösenden Stressors (Taira et al. (2004); Kim et al. (2005); Park et al. (2005)). Ein Verlust von DJ-1 z.B. in *Knockout*-Neuronen dagegen macht Zellen deutlich anfälliger für Stress und führt zu erhöhtem Zelltod durch erhöhte Mengen reaktiver Sauerstoff-Spezies.

Auch PINK1 hat zellprotektive Eigenschaften, bzw. sein Verlust führt zu erhöhter Anfälligkeit gegenüber Stress (Petit (2005); Haque et al. (2008); Exner et al. (2012)). Der genaue Mechanismus hinter dieser Zellprotektivität ist nicht bekannt. Es sind zahlreiche Substrate für PINK1 beschrieben, die aber auf keinen gemeinsamen Signalweg schließen lassen. Man geht davon aus, dass vor allem der Einfluss auf die Mitochondrien zu seinen zellprotektiven Eigenschaften führt (Exner et al. (2012)).

Die Überexpression von Parkin ist zellprotektiv gegenüber einer ganzen Reihe von zellulären Stressoren, ein Verlust von Parkin macht Zellen für Stress deutlich anfälliger (Bouman et al. (2010); Henn et al. (2007)). Mögliche hierfür zugrunde liegende Signalwege wurden mehrere beschrieben (Fallon et al. (2006); Yang et al. (2006); Cha et al. (2005); Hasegawa et al. (2008); da Costa et al. (2009); Johnson et al. (2012)). So konnte gezeigt werden, dass Parkin z.B. den kanonischen NF- κ B-Signalweg, einen Überlebens-Signalweg, induzieren kann und dieser essentiell für die neuroprotektive Eigenschaft von Parkin ist. Ein Verlust von Parkin führt zu einer Beeinträchtigung des NF- κ B-Signalwegs. Seine Aktivierung ist nach Verlust von Parkin deutlich reduziert (Müller-Rischart et al. (2013)). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass OPA1, eine der GTPasen, die die mitochondriale Dynamik regulieren, ein Zielgen des NF- κ B-Signalwegs ist. Eine Induktion von Parkin führt zu einer Induktion des NF- κ B-Signalwegs und somit auch zu höheren OPA1-Mengen (Müller-Rischart et al. (2013)). Dies wirkt zellprotektiv, da OPA1 die Freisetzung von Cytochrom C kontrolliert und somit Einfluss auf Apoptose ausüben kann. In der Tat konnte gezeigt werden, dass das anti-apoptotische Potential von Parkin über eine Verringerung der Freisetzung von Cytochrom C vermittelt wird (Darios et al. (2003)).

Die rezessiv vererbten Gene sind darüber hinaus auch Stress-induzierbare Gene. Es wurde beschrieben, dass unterschiedliche Stressoren zu einer deutlichen Induktion der Gene führt. Erhöhte Mengen könnten, wie z.B. im Falle von Parkin, genutzt werden, um die Zellen effektiv vor Stress-induzierter Apoptose zu schützen (Müller-Rischart et al. (2013); Bouman (2010)).

Shin *et al.* konnten eine weitere, interessante Eigenschaft von Parkin beschreiben und es so mit einem weiteren zellulären Signalweg verknüpfen. Parkin fördert den proteasomalen Abbau von *parkin-interacting substrate* (PARIS), einen transkriptionellen Repressor von *Peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 α* (PGC-1 α). PGC-1 α wiederum ist ein Kofaktor wichtiger Transkriptionsfaktoren wie *nuclear respiratory factor 1* (NRF1), die entscheidend die mitochondriale Biogenese steuern. Ein Verlust von Parkin hemmt durch erhöhte PARIS Mengen die mitochondriale Biogenese (Shin et al. (2011)). Parkin konnte so neben der Beeinflussung der mitochondrialen Dynamik und den zellprotektiven Effekten auch noch mit der Beeinflussung der

transkriptionellen Regulation der mitochondrialen Biogenese in Verbindung gebracht werden.

3.3 Transkriptionelle Regulation mitochondrialer Biogenese

Mitochondrien wurden wahrscheinlich von Zellen in Form von aeroben Bakterien aufgenommen und anschließend als zelluläres Organell in die Zelle integriert (Gray (1999)). Dieser Ursprung erklärt einige Besonderheiten der Mitochondrien, so z.B. die doppelte Membranhülle, aber auch das mitochondriale genetische System. Mitochondrien haben eigene DNA. Sie liegt als kompakte, zirkuläre DNA vor und kodiert für 13 Proteine und 22 tRNAs sowie 2 rRNAs, die für die Translation dieser Proteine nötig sind. Kodiert werden über die mitochondriale DNA essentielle Untereinheiten der Atmungskette, nämlich Komplex I, III, IV und V. Alle weiteren Proteine, die für mitochondriale Funktionen entscheidend sind, werden im Kern der Zelle kodiert und zum bzw. ins Mitochondrium transportiert (Scarpulla (2011)). Auch Faktoren, die die Transkription der mitochondrialen DNA steuern, werden im Kern kodiert. Die regulierenden Faktoren kann man in zwei Klassen einteilen. Zum Einen gibt es kern-kodierte Transkriptionsfaktoren, die die mitochondriale Transkription steuern und zum Zweiten kern-kodierte Faktoren, die die Expression der kern-kodierten Transkriptionsfaktoren für die mitochondriale DNA steuern. In die erste Klasse gehören v.a. die mitochondriale RNA Polymerase (POLRMT) und *transcription factor A, mitochondrial* (Tfam). In der zweiten Klasse spielen v.a. die Transkriptionsfaktoren und ihre Koaktivatoren eine entscheidende Rolle. Dabei sind v.a. NRF1 und PGC-1 α in in letzter Zeit in den Fokus der Forschung gelangt (Scarpulla (2006)).

Bei Untersuchung des Cytochrom C Promotors konnte eine Bindestelle für einen neuen Transkriptionsfaktor, NRF1, entdeckt werden (Evans and Scarpulla (1989)). Später konnte NRF1 auch als Transkriptionsfaktor vieler anderer Genen identifiziert werden, die an der Bildung der Atmungskette selbst, oder an ihrem Aufbau beteiligt sind (Evans and Scarpulla (1990)). Solche Gene sind z.B. am Zusammenbau der Atmungskette beteiligt, Elemente der mitochondrialen DNA-Transkription und deren Replikationsmaschinerie, Enzyme der Häm-Biosynthese und Komponenten des mitochondrialen Proteinimports. NRF1 bindet als Homodimer an palindromische Bindestellen in den Promotoren dieser Gene und aktiviert ihre Transkription und induziert somit mitochondriale Biogenese (Virbasius et al. (1993); Kelly and Scarpulla (2004)). Der Organismus kann somit auf vermehrten Energiebedarf, z.B. in Entwicklungsphasen oder durch körperliches Training, reagieren. Ein deutlicher Zusammenhang zwischen NRF1 und mitochondrialer Funktion wird auch durch Untersuchung der NRF1 *Knockout*-Mäuse sichtbar. Homozygote *Knockout* Mäuse sterben zwischen Tag 3,5 und 6,5 dpc (= *days post coitum*). Die Blastozysten wachsen nicht in Zellkultur, obwohl sie eine normale Morphologie aufweisen, da sie ein deutlich reduziertes mitochondriales Membranpotential sowie dramatisch reduzierte Mengen an mitochondrialer DNA aufweisen (Huo and Scarpulla (2001)). Auf die mitochondrialen Schäden alleine kann die sehr frühe Letalität der Embryonen aber nicht zurückgeführt werden, da Tfam *Knockout*-Mäuse

ähnliche Schäden aufweisen, allerdings deutlich später letal sind (Larsson et al. (1998)). NRF1 scheint also eine weitere Rolle im Zellwachstum und der Entwicklung zuzukommen (Scarpulla (2006)).

Etwa zehn Jahre nach NRF1 konnte ein weiterer wichtiger Spieler in der mitochondrialen Biogenese entschlüsselt werden. Mitochondrien im braunen Fettgewebe werden oft nicht zur Energie sondern zur Wärmeproduktion verwendet, vor allem wenn der Organismus Kälte ausgesetzt ist. PGC-1 α wurde als direkter Koaktivator von = *Peroxisome proliferator activated receptor γ* (PPR γ) in braunem Fettgewebe gefunden und wird durch Kälteexposition massiv erhöht, was zur Induktion von PPR γ und damit zu adaptiver Thermogenese führt (Puigserver et al. (1998)). PGC-1 α zeigt aber auch einen sehr deutlichen Einfluss auf mitochondriale Biogenese. Seine Überexpression führt zu einer deutlichen Erhöhung der mitochondrialen Masse, einer deutlichen Induktion der Gene, die für Komplexe der Atmungskette kodieren und erhöhtem Sauerstoffverbrauch. Dies alles ist abhängig von NRF1. PGC-1 α interagiert dabei direkt mit NRF1 und stellt einen Transkriptionsfaktor von *NRF1* dar (Wu et al. (1999)). PGC-1 α interagiert darüber hinaus auch mit anderen Transkriptionsfaktoren und kann so auch andere Kaskaden wie z.B. die β -Oxidation von Fettsäuren beeinflussen (Kelly and Scarpulla (2004); Scarpulla (2011)). Dies konnte *in vivo* bestätigt werden. Die Überexpression von PGC-1 α führt zu starker mitochondrialer Proliferation. PGC1- α *Knockout*-Mäuse hingegen zeigen nur kleinere mitochondrialen Veränderungen, sind aber zu etwa 50% letal (Lin et al. (2004)). Da PGC-1 α Teil einer Proteinfamilie ist, könnte dies über eventuelle Kompensationsmechanismen durch Familienmitglieder erklärt werden (Scarpulla (2006)).

PGC-1 α selbst wird durch eine Vielzahl direkter und indirekter Faktoren reguliert, deren Expression durch zahlreiche unterschiedliche Umwelteinflüsse wie z.B. Kälte, Energieverlust oder ein Mangel an Nährstoffen und Wachstumsfaktoren gesteuert wird. Die Regulation von *PGC-1 α* wird z.B. von der *AMP-activated protein kinase* (PRKA) übernommen. Erhöhte PRKA-Mengen induzieren *PGC-1 α* und in der Folge auch *NRF1* nach Energieverlust, z.B. nach Anstrengung (Zong et al. (2002); Cantó and Auwerx (2010)); Scarpulla (2008)). Die PRKA ist der “Energiesensor“ der Zelle und wird über das Verhältnis AMP/ATP reguliert (Carling et al. (2011)). Bei verringerten ATP Mengen induziert PRKA katabole Signalwege, um mehr ATP zu generieren. Dies kann z.B. über vermehrte mitochondriale Biogenese geschehen (Abb. 3.7) (Mihaylova and Shaw (2011)).

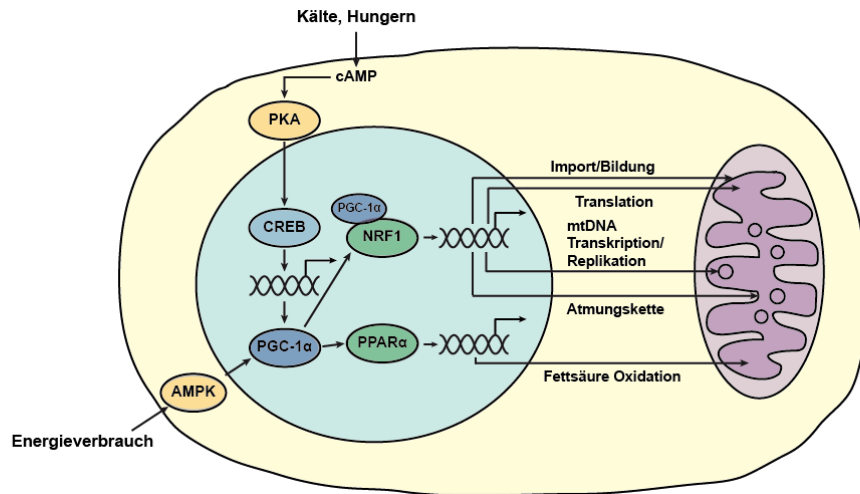


Abbildung 3.7 – Schematische Darstellung der mitochondrialen Biogenese reguliert durch PGC-1 α und NRF1.

Die PGC-1 α Zielgene und Transkriptionsfaktoren NRF1 und PPAR α (grün) sind im Kern (hellblau) der Zelle (gelb) lokalisiert. Sie induzieren die Transkription von im Kern lokalisierten Genen, die spezifische mitochondriale (lila) Funktionen ausüben und mitochondriale Biogenese induzieren. Diese Gene regulieren z.B. den mitochondrialen Import, bzw. bedingen den Aufbau der Mitochondrien. Sie regulieren die mitochondriale Transkription und Translation, die Atmungskette aber auch die Fettsäure-Oxidation. PGC- α (blau) dient dabei als Transkriptionsfaktor, aber auch als Koaktivator für die NRF1 induzierte Transkription. PGC-1 α wird selbst durch Faktoren wie PRKA oder der PKA-Aktivierung gesteuert. Abbildung wurde modifiziert nach Scarpulla (2008).

3.4 Ziele dieser Arbeit

Ein Verlust der Funktion von ATP13A2 durch Mutationen ist die Ursache des Kufor-Rakeb-Syndroms, einem Parkinson+-Syndrom. Außer diesem ursächlichen Zusammenhang war zu Beginn dieser Arbeit nicht viel über die physiologische Funktion des Proteins ATP13A2 bekannt. Daher untersuchten wir strukturelle und funktionelle Aspekte, ebenso wie die transkriptionelle Regulation von ATP13A2.

Ramirez *et al.* konnten 2006 erste charakteristische Merkmale des ATP13A2 Proteins beschreiben. Es wurde eine lysosomale Lokalisation des Wildtyp Proteins nachgewiesen. Die identifizierten Mutanten hingegen unterliegen einer Umverteilung ins Endoplasmatische Retikulum und einem raschen Abbau, was einen Verlust der physiologischen Funktion des Proteins zur Folge hat (Ramirez et al. (2006)). Über sonstige strukturelle und funktionelle Aspekte des Proteins war nicht viel bekannt. Daher wurde in einem ersten Teil die Lokalisation des Proteins und der Einfluss, den Modifikationen der Proteinstruktur auf die Verteilung des Proteins innerhalb der Zelle nehmen, analysiert. Des weitem wurden verschiedene zelluläre Organellen auf einen möglichen Einfluss von ATP13A2 hin untersucht. Sowohl lysosomale als auch mitochondriale Funktionen wurden im ATP13A2 *Knockdown* analysiert. Um weitere charakteristische Merkmale von ATP13A2 zu identifizieren, adressierten wir zusätzlich die Frage der transkriptionellen Regulation und der zellprotektiven Eigenschaften des Proteins.

4 Ergebnisse

4.1 Topologie und subzelluläre Lokalisation von ATP13A2

ATP13A2 kodiert eine P-Typ ATPase, ein großes Transmembranprotein, dessen Substrat bis heute unbekannt ist. Mutationen in ATP13A2 sind ursächlich für das Kufor-Rakeb-Syndrom (KRS) und zudem mit Parkinsonismus assoziiert. Da zu Beginn dieser Arbeit nur wenige Erkenntnisse über das Protein vorlagen, sollten zuerst charakteristische Eckpunkte des Proteins definiert werden. Um erste Erkenntnisse zu gewinnen, wurde die Lokalisation des Proteins, Detektionsmöglichkeiten, Abbauwege und der Einfluss unterschiedlicher Mutationen auf sein Verhalten untersucht. In späteren Experimenten wurden funktionelle Aspekte analysiert.

4.1.1 ATP13A2 ist ein großes Transmembranprotein

Die genaue Struktur von ATP13A2 ist unbekannt, bisher existieren nur computerbasierte Strukturmodellvorhersagen (ch.embnet.org). Laut unserer Vorhersage ziehen sich die 1180 Aminosäuren der längsten Isoform des Proteins in zehn Transmembrandomänen durch die lysosomale Membran. Sowohl der N- als auch der C-Terminus sind dabei ins Zytosol gerichtet (Abb. 4.1). In den beiden großen zytosolischen Domänen zwischen Transmembrandomänen zwei und drei bzw. vier und fünf liegen die für die P-Typ ATPase-Funktion wichtigen Motive der A-, P-, und N-Domäne (Kühlbrandt (2004)). Die KRS-assoziierten Mutanten 1306+5G>A (S13), 1632_1653dup22 (i16) und 3057delC (delC) führen zu einem Verlust der physiologischen Funktion, da durch die Deletion bzw. durch die Verschiebung des Leserahmens frühzeitige Stop-Codone entstehen und so Teile der Transmembrandomänen fehlen (Ramirez et al. (2006)) (Abb. 4.1).

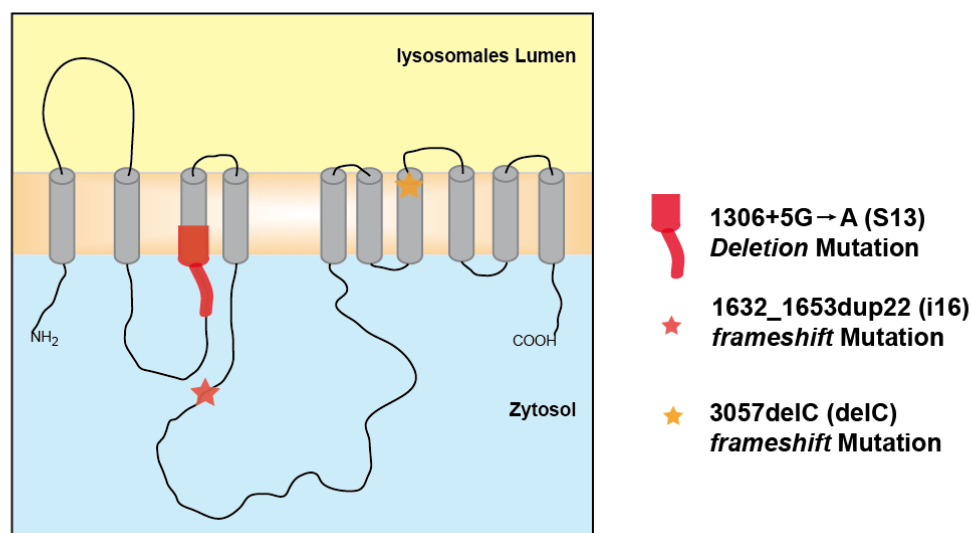


Abbildung 4.1 – Strukturelle Vorhersage von ATP13A2.

ATP13A2 weist zehn Transmembrandomänen auf. Sowohl der N- als auch C-Terminus sind zytosolisch. Die KRS-assoziierten Mutationen sind markiert. Die *frameshift*-Mutationen werden durch Sterne gekennzeichnet, die *in-frame Exon Skipping* Mutation durch die rote Schraffierung.

4.1.2 ATP13A2 ist ein lysosomales Membranprotein

Ramirez *et al.* beschreibt Wildtyp ATP13A2 als ein in der lysosomalen Membran lokalisiertes Protein (Ramirez et al. (2006)). Konstrukte sowohl für Wildtyp ATP13A2 als auch für die KRS-assoziierten Mutanten haben wir freundlicherweise von Prof. Dr. Christian Kubisch erhalten. Da für ATP13A2 leider keine detaillierte Vektorkarte vorlag, wurde das Wildtyp-Gen aus seinem Ursprungsvektor in einen pcDNA 6 Vektor mit C-terminalem V5/His *Tag* umklontiert. Die zelluläre Lokalisation des durch dieses neue Konstrukt kodierten Proteins wurde verifiziert. SH-SY5Y-Zellen wurden transfiziert und die Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz bestimmt. ATP13A2 wurde über seinen V5-*Tag* gefärbt. Es zeigt sich eine vesikuläre Färbung und eine eindeutige Kolokalisation mit *lysosome-associated membran protein 2* (LAMP2), einem Markerprotein der lysosomalen Membran (Saftig (2005)). Das bedeutet, dass die Expression des neuen Konstrukts zu einem korrekt lokalisiertem ATP13A2 Protein in der lysosomalen Membran führt (Abb. 4.2A).

Auch die erhaltenen KRS-assoziierten Mutanten (Ramirez et al. (2006)) wurden auf ihre Lokalisation hin untersucht. Für die Mutanten delC, i16 und S13 ist eine Fehllokalisation im endoplasmatischen Retikulum (ER) beschrieben. Die trunktierten und fehlgefalteten Proteine werden durch die ER-Kontrollmaschinerie erkannt und verlassen das ER erst gar nicht, sondern werden über das Proteasom abgebaut. Daher wird eine Kolokalisation mit dem ER sichtbar (Ramirez et al. (2006)). Die Fehllokalisation der KRS-assoziierten Mutanten wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz in SH-SY5Y-Zellen bestimmt. ATP13A2 wurde über einen V5-Antikörper gefärbt. Es wird eine

deutliche Fehllokalisation der Proteine sichtbar. Die Färbung zeigt keine vesikulären Strukturen mehr auf, sondern deutlich netzwerkartige Strukturen. Eine Fehllokalisation der KRS-assoziierten ATP13A2 Mutanten konnte somit auch in SH-SY5Y-Zellen bestätigt werden (Abb. 4.2B).

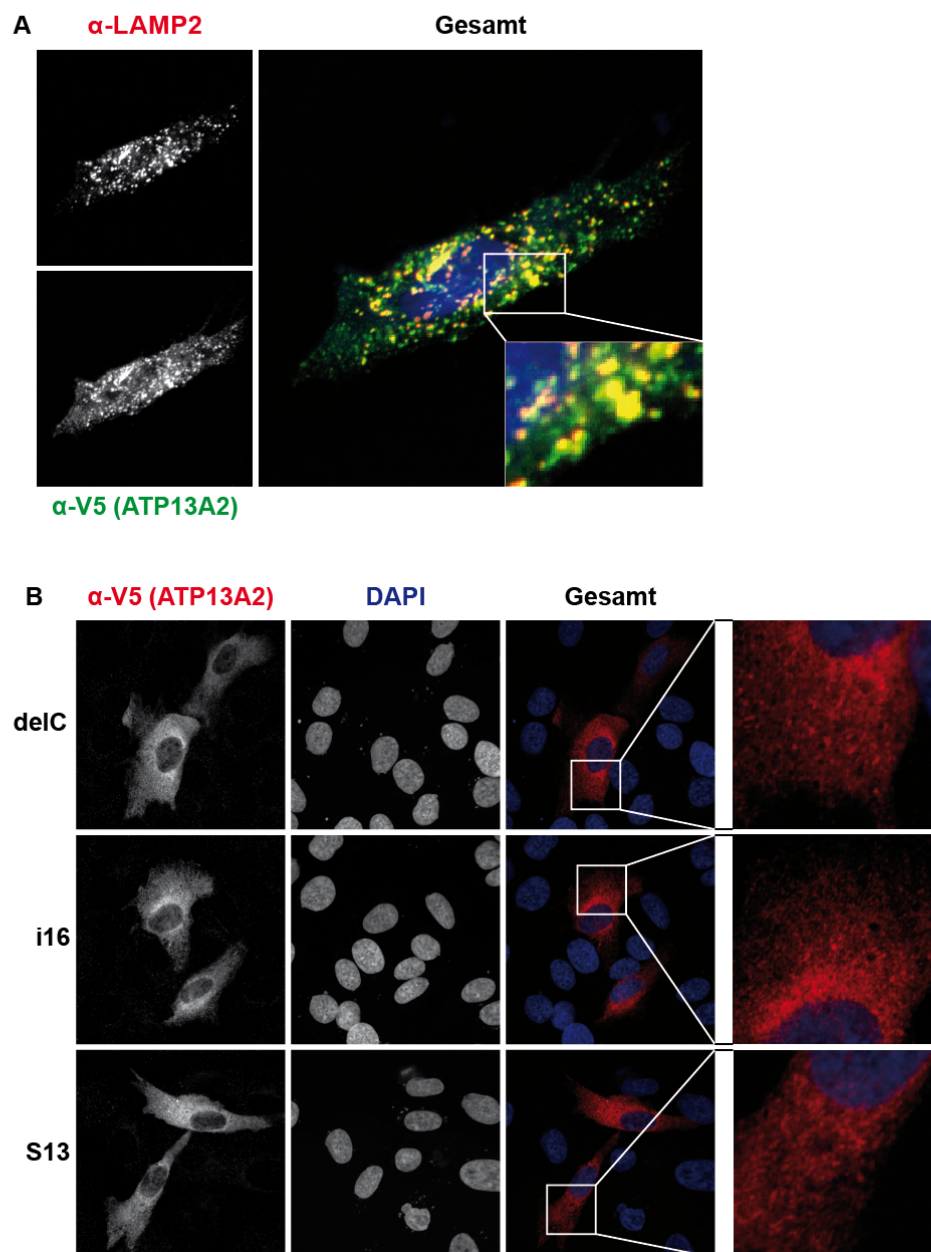


Abbildung 4.2 – Subzelluläre Lokalisation von Wildtyp ATP13A2 und seiner KRS-assoziierten Mutanten.

A) Wildtyp ATP13A2 sitzt in der lysosomalen Membran. Eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung zeigt eine deutliche Kolokalisation zwischen dem V5-Tag von ATP13A2 und LAMP2, einem lysosomalen Membranprotein. B) Die KRS-assoziierten Mutanten zeigen eine deutliche Fehllokalisation. Im Gegensatz zum Wildtyp ATP13A2 mit vesikulärer Lokalisation zeigen sich hier netzwerkartige Strukturen.

4.1.3 Überexprimiertes ATP13A2 kann im *Western Blot* detektiert werden

Neben der Detektion in der indirekten Immunfluoreszenz sollte das Protein auch im *Western Blot* nachgewiesen werden. Daher wurden zu Beginn Lysebedingungen für ATP13A2 etabliert. Die beste Detektion erfolgte nach Lyse in 4x *Lämmli Sample Buffer* (LSB)+8 M Urea im Verhältnis 4:1. Das Protein wurde mittels *Western Blot* unter Verwendung von Antikörpern gegen den V5-Tag von ATP13A2 und eines spezifischen ATP13A2 Antikörpers. Die Detektion des überexprimierten ATP13A2 gelingt dabei sowohl mit dem V5, wie auch mit dem spezifischen ATP13A2-Antikörper (Abb. 4.3). Der spezifische ATP13A2 Antikörper detektiert knapp unter der ATP13A2-Bande eine Bande, die in allen Proben die gleiche Intensität aufweist und somit eine unspezifische Bande darstellt. Endogenes Protein kann durch den spezifischen ATP13A2 Antikörper leider nicht nachgewiesen werden. Daher wurden Aussagen über endogene ATP13A2 Mengen über die Bestimmung der ATP13A2 mRNA mittels quantitativer *real time*-Polymerase Kettenreaktion (RTPCR) getroffen. Es wird davon ausgegangen, dass reduzierte mRNA Mengen auch zu reduzierten Proteinmengen führen.

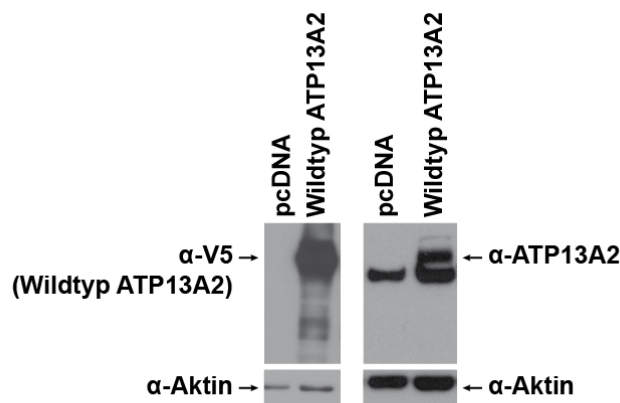


Abbildung 4.3 – Überexprimiertes ATP13A2 kann mittels eines V5 und eines spezifischen ATP13A2-Antikörpers im *Western Blot* detektiert werden.

Eine Detektion von endogenem Protein ist unter diesen Bedingungen nicht möglich.

4.1.4 Wildtyp ATP13A2 und die KRS-assoziierten Mutanten werden unterschiedlich abgebaut

Der Abbau von fehlerhaften Proteinen ist für die Zelle zur Aufrechterhaltung ihrer Protein-Homöostase, das heißt eines funktionierenden Proteoms, essentiell. Der Abbau erfolgt über zwei verschiedene Wege, zum einen über das lysosomale System und zum zweiten über das proteasomale System. Die KRS-assoziierten Mutationen von ATP13A2 führen zu strukturell fehlerhaften

Proteinen und erreichen ihren eigentlichen Funktionsort, die Lysosomen, nicht, wie in der Lokalisationsstudie gezeigt werden konnte (Abb. 4.2). In einer gesunden Zelle werden fehlerhafte und nicht korrekt gefaltete Proteine meist schon im ER erkannt und über den ER-assoziierten Abbauweg (ERAD=*ER-associated degradation*) proteasomal degradiert (Vembar and Brodsky (2008)). Durch eine selektive Inhibition des Proteasoms mit Epoxomycin (Meng et al. (1999)) sollte überprüft werden, ob die KRS-assoziierten Mutanten von ATP13A2 tatsächlich über ERAD proteasomal abgebaut werden. Da der Wildtyp im Lysosom lokalisiert und sein Abbauweg nicht bekannt ist, wurde ferner das Lysosom durch Bafilomycin A1 inhibiert. Bafilomycin A1 inhibiert den lysosomalen Abbauweg durch eine spezifische Inhibition der vakuolären H^+ ATPase, wodurch eine Ansäuerung und somit ein Abbau im Lysosom verhindert wird (Yoshimori et al. (1991)).

SH-SY5Y-Zellen wurden mit Wildtyp ATP13A2 sowie den KRS-assoziierten Mutanten S13, delC und i16 transfiziert und mit Bafilomycin A1 oder Epoxomycin behandelt. Die Proteinmengen wurden mittels *Western Blot* analysiert. Nach lysosomaler Inhibition können erhöhte ATP13A2 Proteinmengen detektiert werden, wohingegen die Mengen nach proteasomaler Inhibition unverändert bleiben. Im Gegensatz dazu erfolgt eine Detektion der Mutanten fast nur nach proteasomaler Inhibition. Unter basalen Bedingungen oder nach lysosomaler Inhibition können sie kaum nachgewiesen werden (Abb. 4.4). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es sich bei Wildtyp ATP13A2 um ein Substrat des lysosomalen Abbauweges handelt, die Mutanten hingegen über das Proteasom abgebaut werden. Darüber hinaus lässt die schlechte Detektion der Mutanten unter basalen Bedingung auf instabile Proteine schließen, die einem schnellen Abbau unterliegen. Der Wildtyp von ATP13A2 wird dagegen stabil exprimiert, sein Abbau erfolgt also deutlich langsamer.

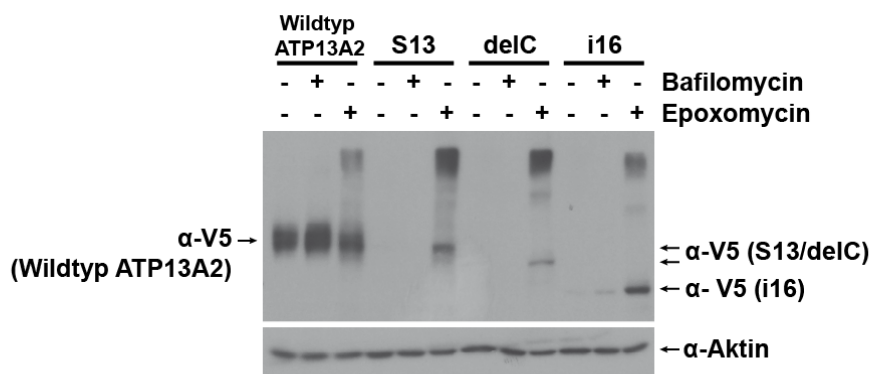


Abbildung 4.4 – Wildtyp ATP13A2 wird lysosomal abgebaut, seine KRS-assoziierten Mutanten über das Proteasom.

Wildtyp ATP13A2 und seine KRS-assoziierten Mutanten wurden in SH-SY5Y-Zellen transfiziert und mit 25 nM Bafilomycin oder 0,1 μ M Epoxomycin behandelt. Der Wildtyp weist eine stabile Expression auf, wohingegen die Mutanten instabil sind und schnell abgebaut werden, so dass sie basal kaum zu detektieren sind.

4.1.5 Identifizierung der lysosomalen Signalsequenz von ATP13A2

Wie deutlich gezeigt werden konnte, ist Wildtyp ATP13A2 in der lysosomalen Membran lokalisiert. Für den Transport eines Transmembranproteins zum Lysosom sind lysosomale Signalsequenzen in den zytosolischen Bereichen des Proteins verantwortlich. Meist bestehen diese Signale aus kurzen, linearen Aminosäuresequenzen zweier verschiedener Klassen, den Tyrosin-basierten und Dileucin-basierten Signalsequenzen. Begleitet werden sie von einigen weiteren wichtigen Parametern, z.B. der Lokalisation und den umgebenden Aminosäuren. Die Signalsequenzen werden von Adapterproteinen auf der Oberfläche der Lysosomen erkannt, was zu einer Integration in die lysosomale Membran führt (Bonifacino and Traub (2003); Braulke and Bonifacino (2009)). Da es sich bei ATP13A2 um ein lysosomales Transmembranprotein handelt, muss auch dieses eine Signalsequenz für die Integration in die lysosomale Membran enthalten.

Daher wurde die Sequenz von Wildtyp ATP13A2 auf eine lysosomale Signalsequenz hin untersucht. Tatsächlich konnte ein Sequenzmotiv GYGTL im N-Terminus gefunden werden, das wichtige Eigenschaften einer Signalsequenz nach dem Tyrosin-Motiv YXXØ enthält. Die im ATP13A2-Motiv vorhandenen Aminosäuren stimmen mit einem klassischen YXXØ-Motiv überein. Es ist sowohl das essentielle Tyrosin (Y) sowie das hydrophobe, mit einer sperrigeren Seitenkette ausgestattete Leucin auf der Ø-Position vorhanden. Die beiden X-Positionen werden durch die Aminosäuren Glycin und Threonin besetzt und erfüllen damit den Trend zu hydrophilen Aminosäuren, die oft an diesen Positionen lokalisiert sind. Auch die Umgebung ist einem YXXØ-Motiv entsprechend, da diesem Motiv oft, so auch im Falle von ATP13A2, ein Glycin voransteht und dadurch vor allem die lysosomale Zielsteuerung unterstützt wird. Das ATP13A2-Motiv ist im N-Terminus lokalisiert. Eigentlich kommt das Motiv meist im C-Terminus vor, es ist jedoch auch eine Lokalisation des YXXØ-Motivs im N-Terminus z.B. für den Transferrin-Rezeptor beschrieben (Bonifacino and Traub (2003)). Einzig eine nahe Lokalisation an der Transmembrandomäne ist mit einem Abstand von mehr als 20 Aminosäuren zur Transmembrandomäne weniger gegeben (Abb. 4.5) (Bonifacino and Traub (2003); Braulke and Bonifacino (2009)).

Um einen möglichen Einfluss dieses Motivs auf die Verteilung des Proteins zum Lysosom hin zu untersuchen, wurden die kritischen Positionen des Motivs YXXØ in AXXA mutiert (Abb. 4.5).

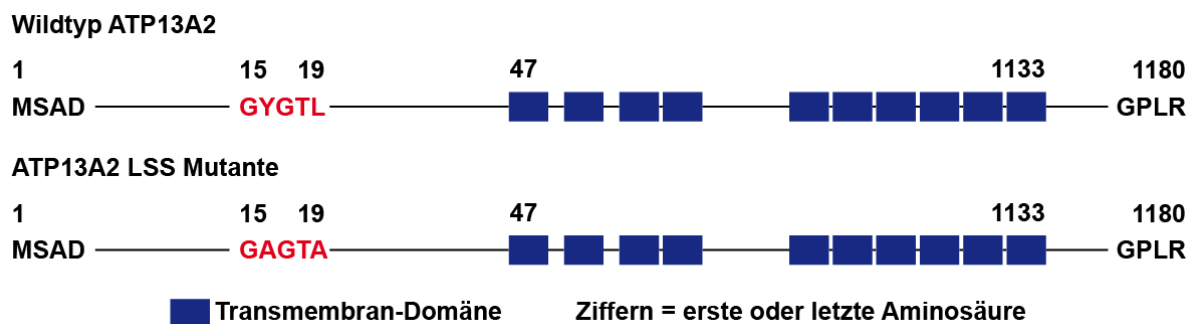


Abbildung 4.5 – Schematische Darstellung der möglichen lysosomalen Signalsequenz nach dem YXXØ-Motiv von ATP13A2.

Die mögliche Signalsequenz ist in rot dargestellt. Es ist jeweils die erste, bzw. letzte Aminosäure mit exakter Positionsangabe versehen. Eine Mutation dieses Motivs wurde durch die Substitution der kritischen Positionen durch Alanin erreicht.

4.1.5.1 Mutationen der möglichen Signalsequenz hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von ATP13A2

Sollte es sich bei der identifizierten möglichen lysosomalen Signalsequenz tatsächlich um die Sequenz handeln, die ATP13A2 ans Lysosom dirigiert, könnten die Mutationen zu einer Umverteilung des Proteins führen. Durch indirekte Immunfluoreszenz wurde die Lokalisation des ATP13A2 Proteins mit mutierter lysosomaler Signalsequenz (LSS) überprüft. Es zeigt sich jedoch weiterhin eine deutlich vesikuläre Färbung und klarer Kolokalisation mit LAMP2 (Abb. 4.6). Im Protein müssen also noch weitere Sequenzen vorhanden sein, die die Verteilung von ATP13A2 ans Lysosom bestimmen. Die alleinige Mutation der kritischen Positionen der möglichen Signalsequenz führt nicht zu einer Umverteilung des Proteins.

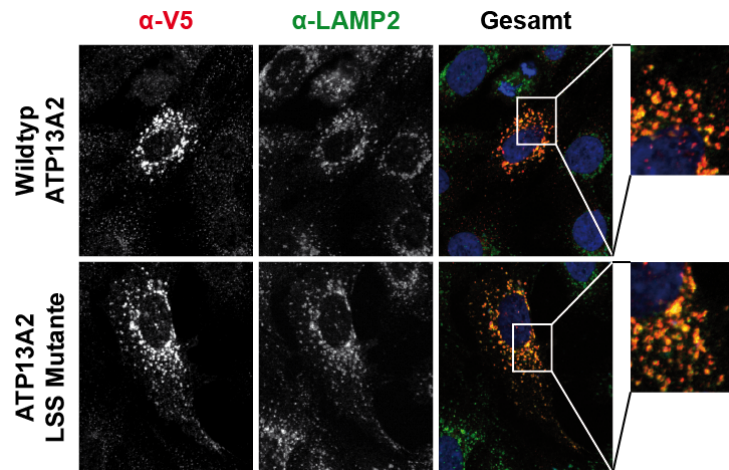


Abbildung 4.6 – ATP13A2 mit mutierter lysosomaler Signalsequenz ist weiterhin lysosomal lokalisiert.

Die transient in SH-SY5Y-Zellen transfizierte ATP13A2 LSS Mutante wurde durch indirekte Immunfluoreszenz detektiert. Es zeigt sich eine eindeutige Kolokalisation mit LAMP2, einem lysosomalen Marker.

4.1.5.2 Eine Deletion des N- und C-Terminus von ATP13A2 führt zur Fehllokalisation des Proteins ins ER

Das Konstrukt mit mutierter LSS ist weiterhin lysosomal lokalisiert. Dies kann daran liegen, dass die identifizierte Sequenz entweder kein Signalmotiv ist, oder noch weitere Signalmotive im Protein vorhanden sind, die weiterhin eine korrekte Lokalisation sicherstellen. Daher wurden Konstrukte, die eine Deletion des N- bzw. C-Terminus von ATP13A2 aufweisen, kloniert und die entstehenden Proteine auf eine eventuelle Umverteilung hin untersucht. Der N- und C-Terminus des Proteins wurde schrittweise deletiert, um eine Eingrenzung möglicher weiterer Motive vornehmen zu können. Die Termini wurden in drei Schritten um jeweils etwa 30 Aminosäuren bis knapp vor die Transmembrandomäne deletiert. In den Konstrukten 1A, 11 und 12 ist die mögliche identifizierte Signalsequenz noch vorhanden, bei den Konstrukten 2A, 21, 22 und 3A, 31 und 32 ist diese deletiert (Abb. 4.7).

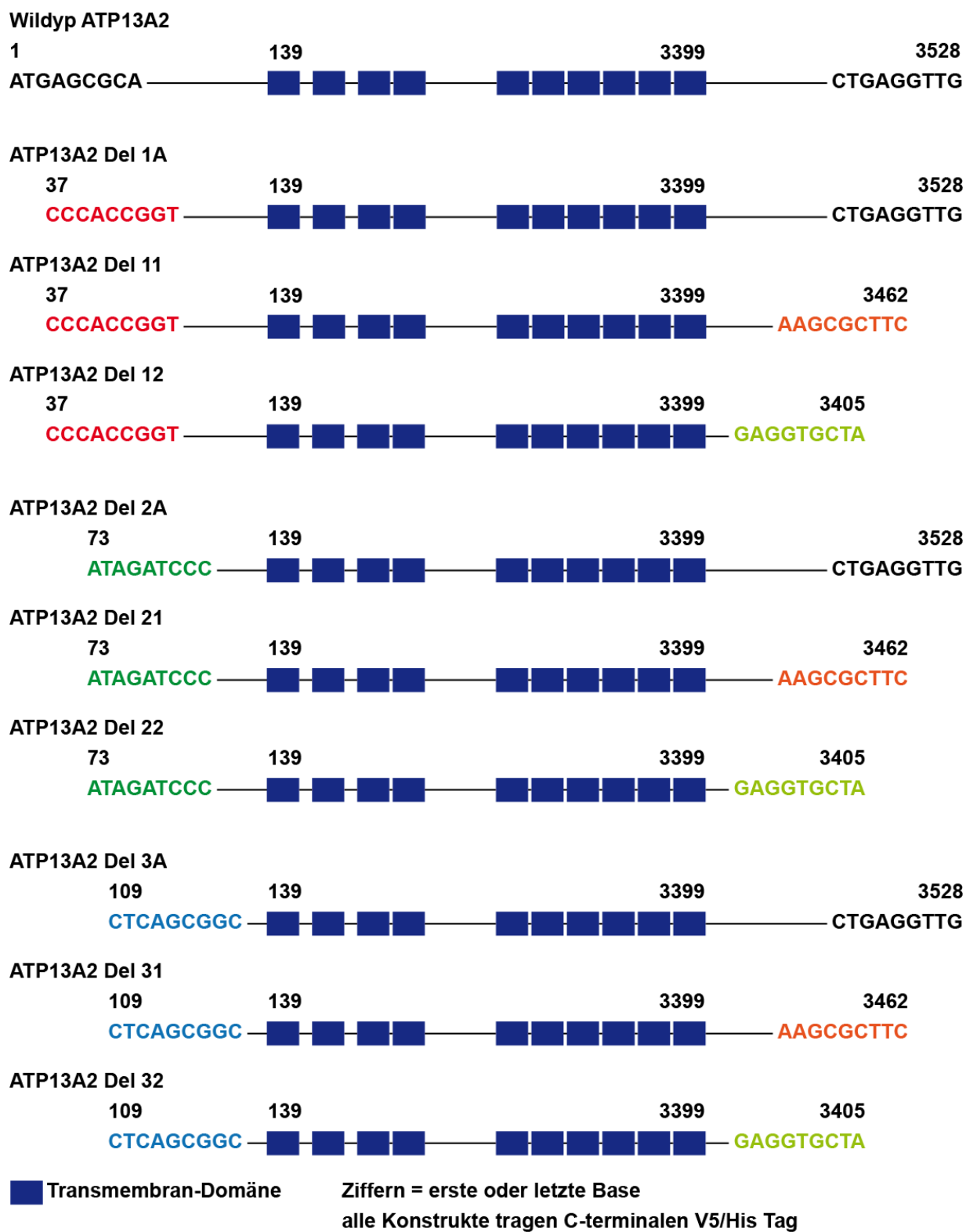


Abbildung 4.7 – Schematische Darstellung der Deletionskonstrukte von ATP13A2.
 Der N- und C-Terminus von ATP13A2 wurden schrittweise deletiert.

Um den Einfluss der Deletionen auf die Proteine genauer zu untersuchen, wurde sowohl die

Lokalisation als auch der Abbau der Proteine genauer untersucht. Die Lokalisation der Deletionsmutanten wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die Deletion von zwölf Aminosäuren des N-Terminus führt zu keiner Veränderung der Lokalisation des Proteins, es weist weiterhin eine vesikuläre Lokalisation auf (Konstrukt 1A) (Abb. 4.8A). Kommt es zu weiteren Deletionen im C-Terminus, oder zu größeren Deletionen im N-Terminus, zeigt sich hingegen ein Unterschied in der Lokalisierung der einzelnen Proteine.

Eine Deletion von zwölf Aminosäuren im N-Terminus in Kombination mit einer Deletion von 22 Aminosäuren im C-Terminus (Konstrukt 11) führt zu einer Fehllokalisierung des Proteins hin zu netzwerkartigen Strukturen. Eine ähnliche Fehllokalisierung wird durch die Deletion des N-Terminus um 24 Aminosäuren erreicht (Konstrukt 2A). In diesem Konstrukt fehlt die möglichen lysosomalen Signalsequenz. Eine weitgehend vollständige Deletion des N- bzw. C-Terminus führt ebenfalls zu der bereits beschriebenen Fehllokalisierung der Proteine (Konstrukt 32) (Abb. 4.8A). Die Mutanten 12, 21 oder 22, 3A und 31 weisen die gleiche netzwerkartige Fehllokalisierung auf wie Konstrukt 32 (Daten nicht gezeigt).

Eine eindeutige Identifizierung der lysosomalen Signalsequenz war über die Deletion der Termini des Proteins leider nicht möglich. Die Deletion des N- oder C-Terminus führt zu einer Umverteilung des Proteins hin zu einer netzwerkartigen Struktur, wie sie auch bei den KRS-assoziierten Mutanten zu beobachten ist. Es lässt sich daher vermuten, dass die Deletionen einen zu großen Eingriff in die Proteinstruktur darstellen und es ähnlich wie bei den KRS-assoziierten Mutanten zu einem Abbau des mutierten Proteins kommt.

Daher wurden die Abbauwege zweier unterschiedlich lokalisierter Vertreter, den Mutanten 1A und 32, untersucht. Es wurde das gleiche Prinzip wie für die Untersuchung des Wildtyps und der KRS-assoziierten Mutanten angewendet. Mit den Mutanten transfizierte Zellen wurden mit Bafilomycin A1 oder Epoxomycin behandelt und die Proteinmengen mittels *Western Blot* analysiert. Ähnlich dem Wildtyp akkumuliert die vesikulär lokalisierte Mutante 1A nach lysosomaler Inhibition. Durch die Inhibition des Proteasoms zeigen sich keine Veränderung der Proteinmenge. Die netzwerkartig verteilte Mutante 32 hingegen verhält sich ähnlich wie die KRS-assoziierten Mutanten. Nach proteasomaler Inhibition können höhere Mengen nachgewiesen werden, wohingegen die Mengen durch lysosomale Inhibition unbeeinflusst sind (Abb. 4.8B).

Bei den Deletionsmutaten von ATP13A2 handelt es sich also ebenfalls um Substrate des proteasomalen Abbaus und so wahrscheinlich des ERAD. Einzig die Mutante 1A weist eine korrekte Lokalisation und einen Abbau über das Lysosom auf. Funktionsfähiges ATP13A2 scheint also in hohem Maße auf eine korrekte Proteinstruktur angewiesen zu sein und in seinem N- und C-Terminus wichtige strukturelle Elemente zu beinhalten, deren Fehlen direkt zu einem Abbau über das Proteasom führt.

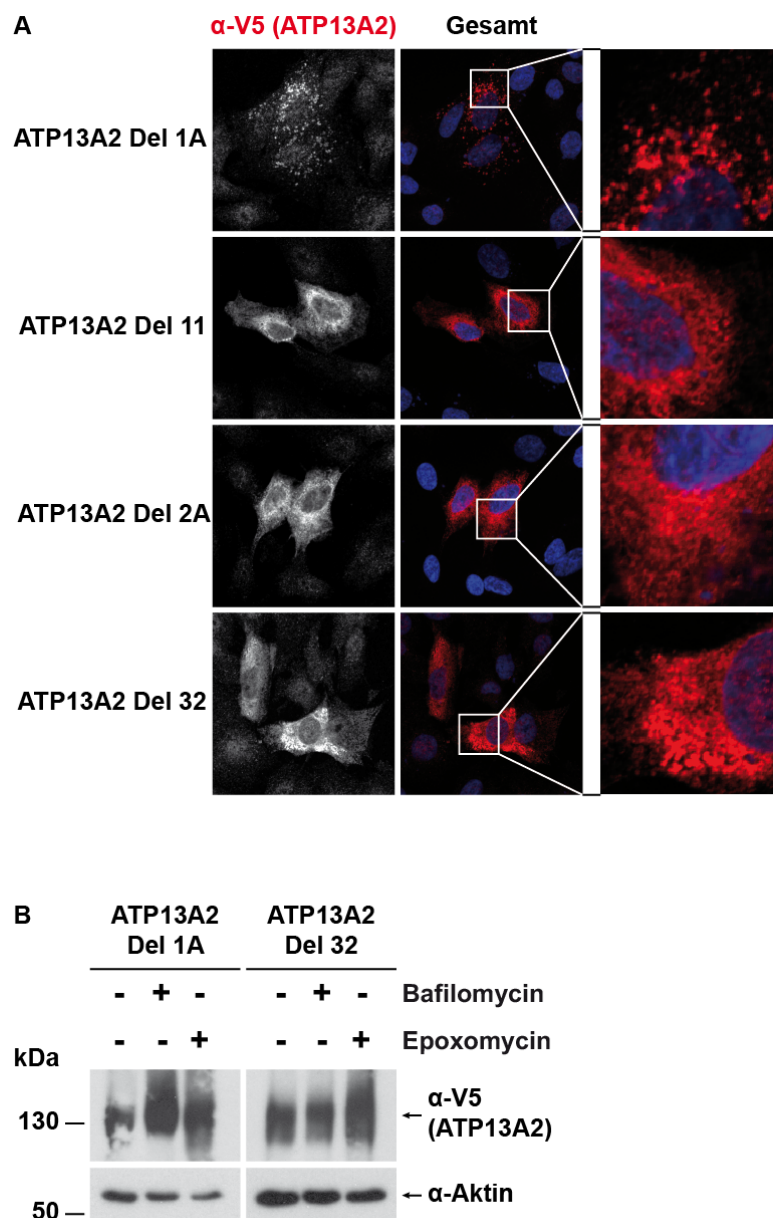


Abbildung 4.8 – Die Deletion des N- und C-Terminus von ATP13A2 führt zur Fehllokalisierung und einem Abbau über das Proteasom.

A) Die Deletion von zwölf Aminosäuren des N-Terminus beeinflusst die Lokalisation des Proteins nicht. Der Verlust weiterer Teile des N- oder C-Terminus hingegen führt zu einer Fehllokalisierung der Mutanten. B) Das lysosomal lokalisierte ATP13A2 Del 1A wird lysosomal abgebaut, das fehllokalisierte ATP13A2 Del 32 hingegen über das Proteasom.

4.2 Der Einfluss von ATP13A2 auf Zellorganellen

Die genaue Funktion von ATP13A2 ist bislang nicht bekannt. Seine Lokalisation in der lysosomalen Membran legt eine Beteiligung an der Funktionalität des Lysosoms nahe. Wie diese jedoch aussehen könnte und ob eventuell auch andere zelluläre Organellen und Signalwege von ATP13A2

beeinflusst werden, war zu Beginn dieser Arbeit noch ungeklärt. Daher wurden verschiedene zelluläre Organellen auf einen möglichen Einfluss von ATP13A2 hin untersucht. Dabei standen die Funktionalität von Lysosomen und Mitochondrien im Mittelpunkt.

4.2.1 Etablierung des *Knockdowns* von ATP13A2 als Modell

Wie wir bereits zeigen konnten, gelangen die KRS-assoziierten Mutanten nicht an ihren Zielort in der lysosomalen Membran sondern werden vorzeitig über das Proteasom abgebaut. Daher können sie ihre physiologische Funktion nicht mehr erfüllen. Welche Konsequenzen und Einflüsse dieser Funktionsverlust auf zelluläre Organellen und die Zelle im Gesamten hat, sollte anhand eines Zellkulturmodells untersucht werden. Dafür wurden *Knockdown*-Modelle in Säugerzellen mittels RNA Interferenz (RNAi) etabliert und verschiedene zelluläre Aspekte untersucht.

4.2.1.1 Etablierung eines transienten *Knockdowns* von ATP13A2

Die Einflüsse eines Verlusts von ATP13A2 wurden mittels eines transienten *Knockdowns* untersucht. Hierfür wurde eine Kombination von zwei verschiedenen siRNAs verwendet und in einer Konzentration von je 20 nM in die Zielzellen transfiziert. Als Kontrolle wurde eine entsprechende Kontroll-siRNA transfiziert. Die ATP13A2 mRNA Menge wurde mittels RTPCR bestimmt. Eine Expression über 72 h führt zu einem hochsignifikanten und robusten *Knockdown* von ATP13A2 mit einer *Knockdown*-Effizienz von 80-90 % (Abb. 4.9).

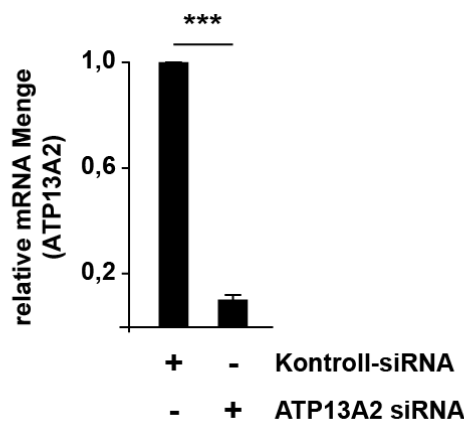


Abbildung 4.9 – Der transiente *Knockdown* von ATP13A2 mittels siRNA führt zu einer effizienten und signifikanten Reduktion der mRNA Menge von ATP13A2.

SH-SY5Y-Zellen wurden revers mit einer Kombination aus zwei verschiedenen ATP13A2-spezifischen siRNA Duplexen bzw. der entsprechenden Kontrolle transfiziert. Nach 72 h wurden die mRNA Menge mittels RTPCR mit ATP13A2-spezifischen Primern analysiert. Gezeigt ist die relative mRNA Menge bezogen auf die Kontrolle. Die mRNA Menge des Zielgens einer jeden Probe wurde auf die Menge der mRNA des *Housekeeping*-Gens β -Aktin normiert. n=5, *** $p < 0,001$.

4.2.1.2 Etablierung eines stabilen *Knockdowns* von ATP13A2

Für die Untersuchungen zur Mitophagie wurde durch lentivirale Transduktion von shRNA ein stabiler *Knockdown* in HeLa-Zellen erzeugt. Die *Knockdown*-Effizienz wurde mittels RTPCR bestimmt. Zwei Zelllinien weisen einen für Wochen stabilen, hochsignifikanten *Knockdown* mit einer Effizienz von etwa 70 % auf. Die *Knockdown*-Effizienz wurde über einen Zeitraum von sechs Wochen in Triplikaten bestimmt. Beide Zelllinien wurden für weitere Experimente verwendet (Abb. 4.10).

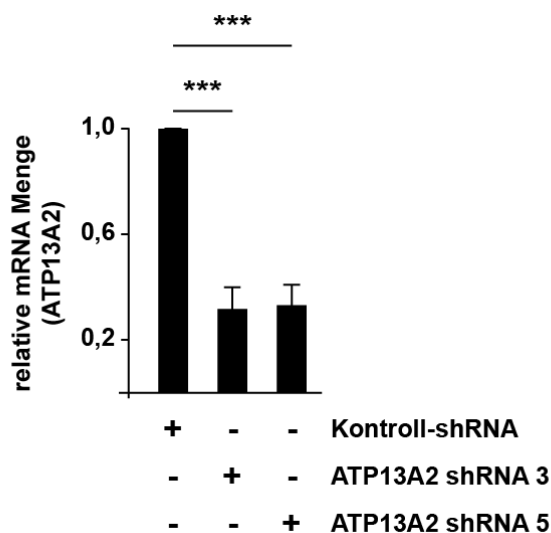


Abbildung 4.10 – Der stabile *Knockdown* von ATP13A2 mittels shRNA führt zu einer signifikanten Reduktion der mRNA Menge von ATP13A2.

HeLa-Zellen wurden mit zwei unterschiedlichen ATP13A2-spezifischen shRNA Konstrukten oder der entsprechenden Kontrolle transduziert. Die mRNA Menge wurden mittels RTPCR mit ATP13A2-spezifischen Primern analysiert. Gezeigt ist die relative mRNA Menge bezogen auf die Kontrolle. Die mRNA Menge des Zielgens einer jeden Probe wurde auf die Menge der mRNA des *Housekeeping*-Gens β -Aktin normiert. n=3, *** p<0,001.

4.2.2 Die lysosomale Verteilung und Aktivität bleibt durch einen ATP13A2 *Knockdown* unbeeinflusst

ATP13A2 ist ein Protein der lysosomalen Membran und ist als P-Typ ATPase für den Transport eines Substrats über die Membran hinweg verantwortlich (Kühlbrandt (2004)). Da allerdings weder das Substrat noch eine genauere Funktion von ATP13A2 bekannt ist, wurden initiale funktionale Untersuchungen für das Protein am Lysosom durchgeführt. Als lysosomales Membranprotein legt ein Funktionsverlust des Proteins eine funktionelle Beeinträchtigung des Lysosoms nahe.

4.2.2.1 Die Verteilung, Morphologie und Aktivität der Lysosomen ist im ATP13A2 *Knockdown* nicht beeinträchtigt

Lysosomen sind membranumschlossene, kleine, saure Vesikel, die vor allem für den Abbau von zellulärem Material zuständig sind und in der ganzen Zelle verteilt vorliegen. Funktionsfähige Lysosomen sind für eine gesunde Zelle unerlässlich. Kommt es zu Funktionsverlusten, kann dies zu ganz unterschiedlichen Krankheiten führen (Futerman and van Meer (2004); Saftig (2005)). Es wurde untersucht, ob der Verlust des lysosomal lokalisierten ATP13A2 einen Einfluss auf allgemeine lysosomale Kennzeichen und lysosomale Aktivität besitzt.

Die lysosomale Morphologie und Verteilung wurde in SH-SY5Y-Zellen nach transientem *Knockdown* untersucht. Die Lysosomen wurden durch indirekte Immunfluoreszenz mit einem LAMP2-Antikörper sichtbar gemacht. Wie in den beiden Beispielen gezeigt, ergeben sich durch eine Reduktion der ATP13A2 Menge im Vergleich zur Kontrolle keine sichtbaren Unterschiede in Bezug auf Verteilung und Morphologie der Lysosomen. Die Lysosomen liegen als kleine, in der gesamten Zelle verteilte Vesikel vor (Abb. 4.11A). Auch die lysosomale Masse ist in den ATP13A2 *Knockdown*-Zellen im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert. Die LAMP2 Proteinmengen sind konstant (Abb. 4.11B).

Ein Marker für die Funktionalität der Lysosomen stellt die Maturierung von Cathepsinen dar (Saftig (2005)). Aber auch hier zeigt sich keine wesentliche Beeinträchtigung. Sowohl bei matu-rem, als auch bei immatorem Cathepsin D zeigen sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen dem ATP13A2 *Knockdown* und der Kontrolle. Die Maturierung der Cathepsine ist nicht beeinträchtigt (Abb. 4.11B). Diese ersten Untersuchungen allgemeiner lysosomaler Parameter ergeben also keinen sichtbaren Einfluss von ATP13A2 auf die lysosomale Funktion.

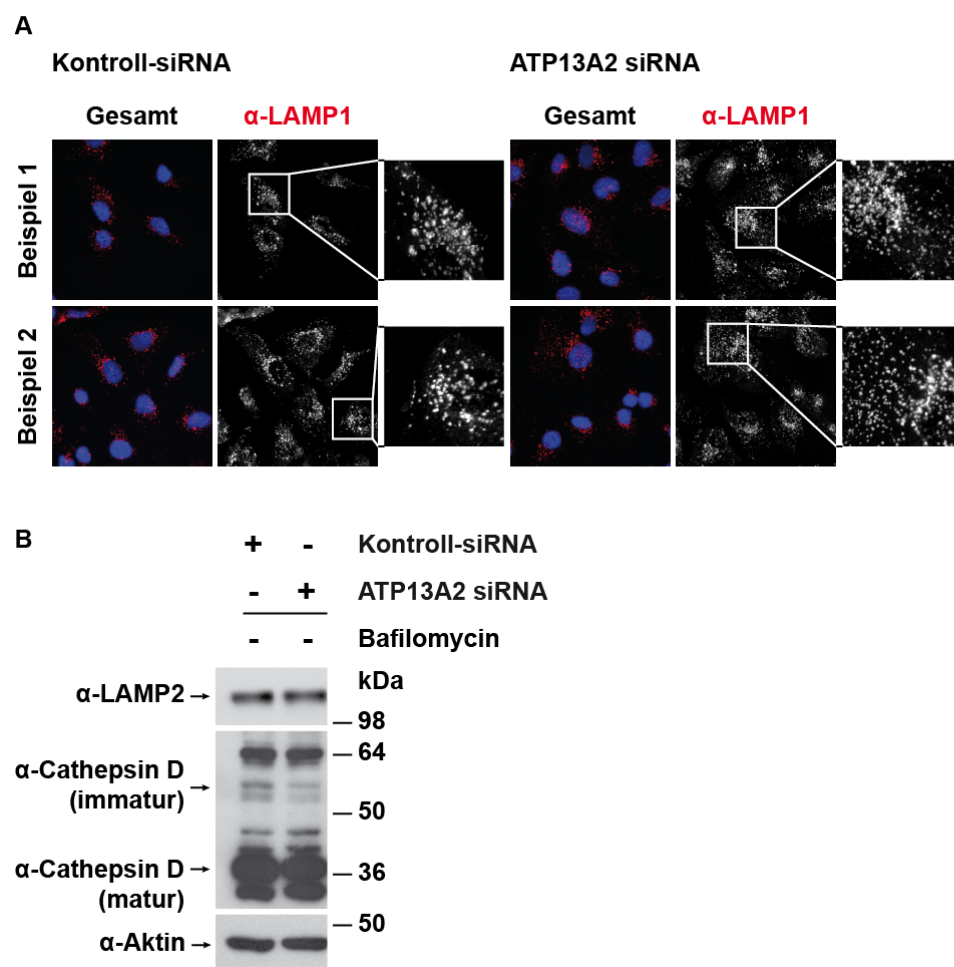


Abbildung 4.11 – Die Verteilung, Morphologie und Aktivität der Lysosomen ist nach einer Reduktion von ATP13A2 nicht beeinträchtigt.

A) Eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung zeigt keine Unterschiede in Verteilung oder Morphologie der Lysosomen nach ATP13A2-*Knockdown*. B) Die lysosomale Masse sowie die lysosomale Aktivität sind nach *Knockdown* von ATP13A2 nicht verändert. Es zeigen sich keine Unterschiede in den Proteinmengen von LAMP2 oder in der Maturierung von Cathepsin D.

4.2.2.2 ATP13A2 und ein möglicher Einfluss auf Mitophagie

Funktionale Lysosomen spielen auch im Prozess der Autophagie eine große Rolle. Mitophagie bezeichnet den Prozess des Abbaus von Mitochondrien durch Autophagie unter der Beteiligung der Lysosomen. Kommt es zu einer Schädigung der Mitochondrien, im Versuchsaufbau wird dies durch den mitochondrialen Entkoppler Carbonylcyanid 3-chlorophenylhydrazon (CCCP) initiiert (Lou et al. (2007)), führt dies zu einer Rekrutierung von Parkin an die geschädigten Mitochondrien, was wiederum den Abbau der Mitochondrien über Autophagie einleitet (Pils and Winklhofer (2012); Youle and Narendra (2011)). Dieser Mechanismus kann durch Immunfluoreszenz-Färbungen sehr gut dargestellt werden. HeLa-Zellen, die kein endogenes Parkin enthalten, werden mit Parkin

transfiziert und anschließend mit CCCP behandelt. Nach 1 h ist die Rekrutierung von Parkin an die Mitochondrien deutlich sichtbar. Nach 24 h sind die Mitochondrien über Mitophagie komplett abgebaut, die mitochondriale Färbung durch den Marker Hitzeschockprotein60 (HSP60) (uniprot.org (b)) ist verschwunden und Parkin liegt wieder in seiner zytosolischen Form vor (Abb. 4.12A).

4.2.2.2.1 Mitophagie wird durch eine Überexpression von ATP13A2 nicht beeinflusst

Um einen möglichen Einfluss von ATP13A2 auf die Mitophagie zu untersuchen und somit Rückschlüsse auf die lysosomale Funktion gewinnen zu können, wurden in einem ersten Schritt HeLa-Zellen, die ATP13A2 stabil überexprimieren, mit Wildtyp Parkin transfiziert und der Mitophagie *Assay* wie zuvor beschrieben durchgeführt. Als Kontrolle dienen Zellen, die statt mit Parkin mit Leervektor transfiziert wurden. Verglichen wurde die Anzahl Zellen, die nach 24 h CCCP-Behandlung in Anwesenheit von Parkin keine Mitochondrien mehr enthielten. Die mikroskopische Analyse der Zellen zeigt, dass Mitophagie tatsächlich nur in Parkin-transfizierten Zellen stattfindet. Zellen ohne Parkin weisen keinerlei Mitophagie auf. Dabei zeigt sich aber auch, dass ATP13A2 keinen Einfluss auf die Mitophagie nimmt. Die Anzahl an Zellen ohne Mitochondrien liegt nach 24 h CCCP-Behandlung sowohl in der Kontrolle als auch in den ATP13A2-transduzierten Zellen stabil bei etwa 60% (Abb. 4.12B). Erhöhte ATP13A2 Mengen haben also keinen Einfluss auf die Mitophagierate. Die Experimente wurden freundlicherweise von Frau Dr. Anna Pilschl durchgeführt.

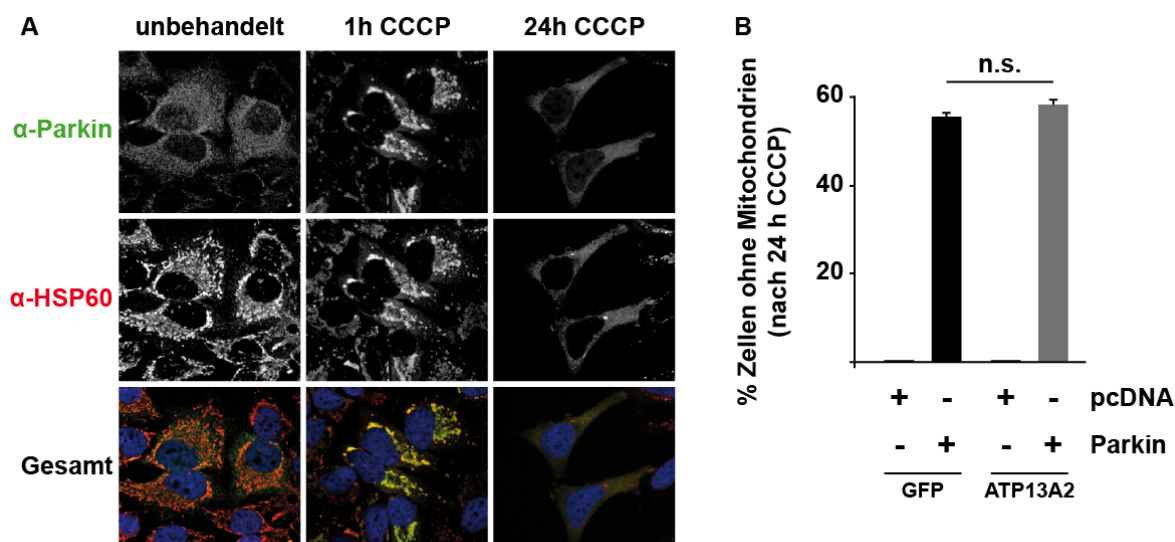


Abbildung 4.12 – Die Überexpression von ATP13A2 beeinflusst Mitophagie nicht.

A) Gezeigt ist der Parkin-induzierte Mechanismus der Mitophagie. Die Behandlung von stabil mit Parkin transduzierten HeLa-Zellen mit CCCP führt zu Mitophagie. Nach einstündiger Behandlung ist eine Rekrutierung von Parkin an die Mitochondrien sichtbar, nach 24 h sind die Mitochondrien abgebaut und Parkin liegt wieder zytosolisch verteilt vor. B) Die Überexpression von ATP13A2 hat keinen Einfluss auf die Mitophagie. Stabil mit ATP13A2 transduzierte HeLa-Zellen wurden mit Parkin oder Leervektor als Kontrolle transient transfiziert und für 24 h mit 10 μ M CCCP behandelt. Mit GFP transduzierte HeLa-Zellen wurden als Kontroll-Zellen für den Einfluss von ATP13A2 verwendet. Die Auswertung der Immunfluoreszenz zeigt keinen Einfluss von ATP13A2 auf die Mitophagierate. Pro Bedingung wurden mindestens 300 Zellen ausgezählt. n=3, n.s. $p>0,05$.

4.2.2.2 Mitophagie wird durch einen *Knockdown* von ATP13A2 nicht beeinflusst

In einem zweiten Schritt sollte auch der Einfluss von reduzierten ATP13A2 Mengen auf die Mitophagie untersucht werden. Die KRS-assoziierten Mutanten führen zu einem Funktionsverlust, der durch einen *Knockdown* sehr gut imitiert werden kann. Die Experimente wurden von Frau Dr. Anna Pils durchgeföhrt. Für den Versuch wurden stabile, mit Parkin transfizierte ATP13A2 *Knockdown*-Zellen verwendet. Mitophagie findet wieder nur in Parkin-transfizierten Zellen statt. ATP13A2 weist dabei keinen Einfluss auf die Mitophagierate auf. Sowohl in den Kontroll-Zellen, als auch in den *Knockdown*-Zellen werden ähnlich hohe Mitophagieraten von etwa 45% detektiert (Abb. 4.13). Es zeigt also weder die Überexpression von ATP13A2, noch der *Knockdown* einen Einfluss auf die Parkin-induzierte Mitophagie. Der lysosomale Abbau von Mitochondrien scheint durch ATP13A2 nicht beeinflusst zu werden.

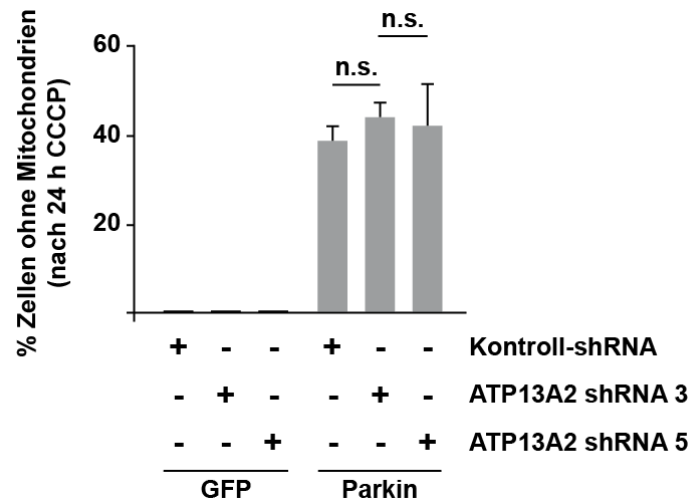


Abbildung 4.13 – Eine Reduktion von ATP13A2 beeinflusst Mitophagie nicht. In zwei unterschiedlichen, stabilen ATP13A2 *Knockdown* Zelllinien wird die gleiche Mitophagierate detektiert wie in den Kontrollzellen. Pro Bedingung wurden mindestens 300 Zellen gezählt. n=3, n.s. $p > 0,05$.

4.2.3 Die mitochondriale Morphologie und Funktion weist im ATP13A2 *Knockdown* Veränderungen auf

Die Lysosomen scheinen durch einen *Knockdown* von ATP13A2 nicht beeinflusst. Im Rahmen der Untersuchungen zur Mitophagie ist jedoch ein anderes Zellorganell in den Fokus der Untersuchungen gelangt. In den ATP13A2 *Knockdown*-Zellen sind Veränderungen an der mitochondrialen Morphologie aufgefallen. Da der Verlust auch anderer Parkinson-assoziiierter Proteine, z.B. Parkin oder PINK1 zu mitochondrialen Veränderungen führen (Exner et al. (2007); Lutz et al. (2009)) und dieses Organell somit eine Gemeinsamkeit der Parkinson-assoziierten Proteine darstellen könnte, wurde dieser Aspekt genauer untersucht.

4.2.3.1 Mitochondrien kondensieren im ATP13A2 *Knockdown* um den Zellkern

Zur genaueren Analyse der mitochondrialen Morphologie wurden ein *Knockdown* in SH-SY5Y-Zellen durchgeführt und die mitochondriale Struktur über indirekte Immunfluoreszenz untersucht. Mitochondrien wurden über die Färbung des mitochondrialen Proteins *mitochondrial import receptor subunit TOM 20* (TOM20) (uniprot.org (d)), ein Protein der äußeren mitochondrialen Membran, sichtbar gemacht und ihre Morphologie mikroskopisch analysiert. Die Kontrollzellen weisen ein intaktes, tubuläres Netzwerk von Mitochondrien auf (Westermann (2010)). Im ATP13A2 *Knockdown* hingegen ist die Verteilung der Mitochondrien deutlich verändert. Anstatt eines Netzwerks, das in der gesamten Zelle bis in die Ausläufer der Zellen reicht, kondensieren die Mitochondrien rund um den Kern. Verzweigungen bis in die Zellspitzen fehlen (Abb. 4.14A). Signifikant mehr Zellen weisen im *Knockdown* solch veränderte Mitochondrien im Gegensatz zur

Kontrolle auf (Abb. 4.14B). Ein effizienter *Knockdown* von ATP13A2 wurde für alle Experimente bestätigt (Abb. 4.14C).

Um festzustellen, ob der *Knockdown* von ATP13A2 nur zu einer Umverteilung der Mitochondrien führt oder aber auch einen Einfluss auf die mitochondriale Masse hat, wurden die Proteinmengen verschiedener mitochondrialer Proteine analysiert. Drei Proteine der mitochondrialen Bereiche äußere und innere Membran sowie mitochondrialer Matrix wurden untersucht. *voltage-dependent anion-selective channel protein 1* (VDAC) (uniprot.org (e)) sitzt in der äußeren mitochondrialen Membran, wohingegen *mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44* (TIMM44) (uniprot.org (c)) an der inneren mitochondrialen Membran positioniert ist. HSP60 befindet sich in der mitochondrialen Matrix (uniprot.org (b)). Die Proteinmengen der drei Proteine zeigen im *Western Blot* keine Unterschiede zwischen der Kontrolle und dem ATP13A2 *Knockdown*, die Mengen sind in beiden Fällen vergleichbar (Abb. 4.14D). Der *Knockdown* von ATP13A2 beeinflusst also die mitochondriale Morphologie und Verteilung, nicht aber die mitochondriale Masse.

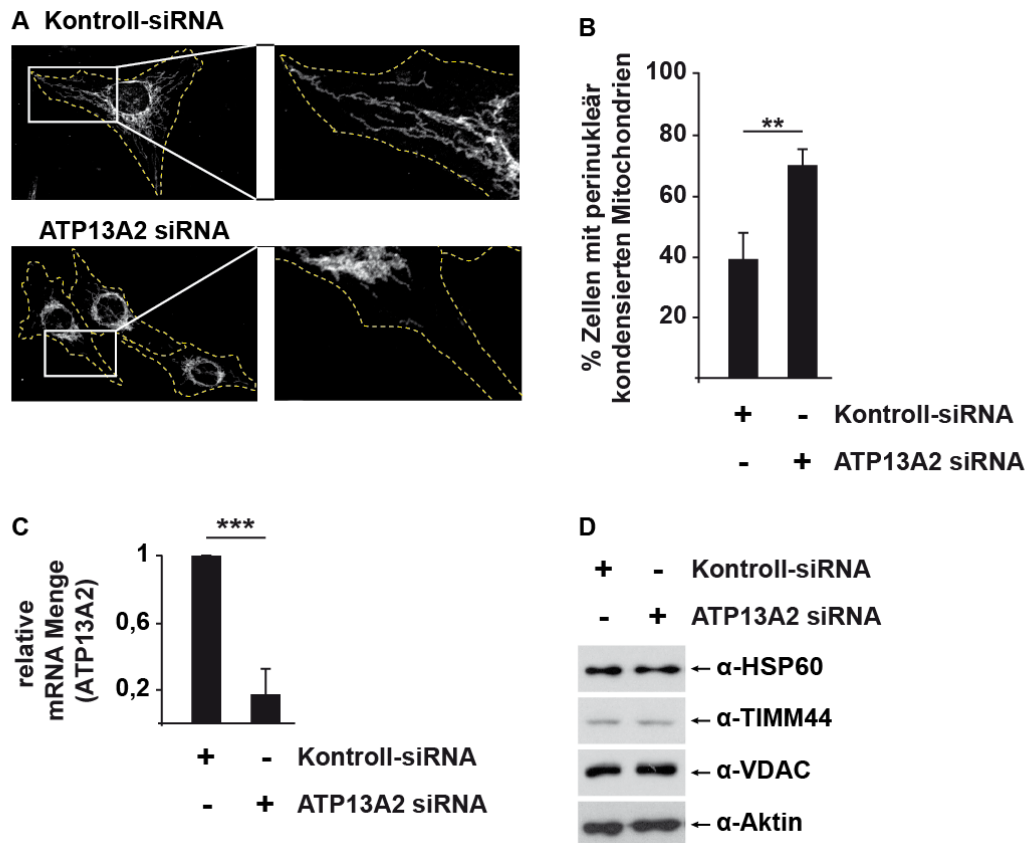


Abbildung 4.14 – Ein *Knockdown* von ATP13A2 führt zur Kondensation der Mitochondrien rund um den Kern.

A) Mitochondrien kondensieren nach einem *Knockdown* von ATP13A2 rund um den Kern und weisen keine Ausläufer in die Zellperipherie mehr auf. B) Die Quantifizierung der mitochondrialen Verteilung erfolgte durch Einteilung der Mitochondrien in die Gruppe “Intakt“, sofern die Zelle ein intaktes mitochondriales Netzwerk mit tubulären Mitochondrien, die bis in die Ausläufer der Zellen reichten, aufwies. Zellen mit Mitochondrien, die um den Kern kondensiert waren und keine Ausläufer in die Zellperipherie mehr aufwiesen, wurden als “kondensiert“ klassifiziert. Es wurden pro Bedingung mindestens 300 Zellen ausgezählt. $n=3$, ** $p<0,01$. C) Die *Knockdown*-Effizienz zu den Versuchen wurde mittels RTPCR wie in Fig. 4.9 überprüft. $n=3$, *** $p<0,001$. D) Die mitochondriale Masse ist nicht verändert. Die Proteinmengen wurden mittels *Western Blot* unter Verwendung von Antikörpern gegen die mitochondrialen Markerproteine HSP60, TIMM44, VDAC und als Ladekontrolle β -Aktin analysiert.

4.2.3.2 Die ATP-Produktion ist im ATP13A2 *Knockdown* beeinträchtigt

Ein *Knockdown* von ATP13A2 führt zu einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Verteilung. Damit einher kann eine Beeinträchtigung der ATP-Synthese gehen, da intakte Mitochondrien den Produktionsort des ATPs darstellen. Tatsächlich ist die ATP-Produktion im ATP13A2 *Knockdown* verringert. SH-SY5Y-Zellen wurden revers mit siRNA transfiziert und der ATP-Gehalt nach 72 h luminometrisch bestimmt. Der zelluläre Gesamt-ATP-Gehalt sinkt nach einem *Knockdown* von ATP13A2 auf etwa 80% im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4.15A). Die *Knockdown*-Effizienz

liegt bei über 80% (Abb. 4.15B).

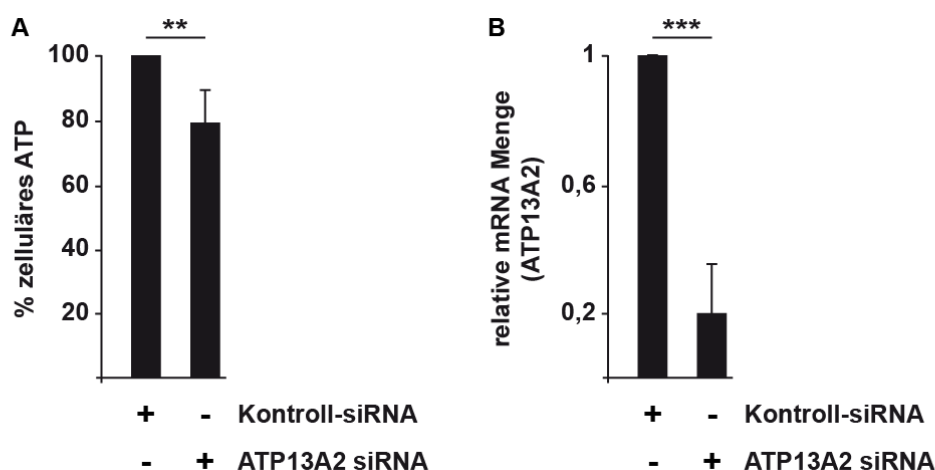


Abbildung 4.15 – Die ATP-Produktion ist nach einem *Knockdown* von ATP13A2 beeinträchtigt.

A) Die zellulären ATP-Mengen wurden nach einem *Knockdown* von ATP13A2 luminometrisch bestimmt. n=3, ** p<0,01. B) Die *Knockdown*-Effizienz zu den Versuchen wurde mittels RTPCR wie in Fig. 4.9 überprüft. n=3, *** p<0,001.

4.2.3.3 ATP13A2 revertiert die α -Synuklein-induzierte mitochondriale Fragmentierung

Einen weiteren Hinweis auf eine Verbindung zwischen ATP13A2 und der mitochondrialen Morphologie zeigte sich im Zusammenhang mit α -Synuklein. Kamp *et al.* konnten zeigen, dass erhöhte Mengen α -Synuklein, wie sie auch in Morbus Parkinson Fällen mit Mutationen in α -Synuklein vorkommen, die mitochondriale Fusion inhibieren und somit zu mitochondrialer Fragmentierung führen (Kamp et al. (2010)). Die autosomal rezessiv vererbten, mit Parkinsonismus assoziierten Gene *PINK1*, *Parkin* und *DJ-1* sind durch Überexpression in der Lage, die durch α -Synuklein induzierte mitochondriale Fragmentierung zu revertieren. Gleichzeitig führt ein *Knockdown* eines jeden der genannten Gene zu Beeinträchtigungen der mitochondrialen Morphologie (Exner et al. (2007); Lutz et al. (2009); Irrcher et al. (2010)). Da ein *Knockdown* von ATP13A2 ebenfalls Auswirkungen auf die mitochondriale Morphologie zeigt, sollte sein Einfluss auf die α -Synuklein induzierte mitochondriale Fragmentierung überprüft werden. Die Experimente wurden von Frau Dr. Anne-Kathrin Müller-Rischart durchgeführt.

SH-SY5Y-Zellen wurden mit α -Synuklein oder A53T, einer pathogenen α -Synuklein-Mutante, transfiziert. Als Transfektionskontrolle wurde eine Ko-Transfektion mit mCherry durchgeführt. Die Mitochondrien wurden über TOM20 angefärbt. Die mikroskopische Analyse zeigt, dass erhöhte Mengen von α -Synuklein oder A53T zu einer Fragmentierung der Mitochondrien führen, wie schon in Kamp *et al.* beschrieben. Eine Ko-Transfektion von Wildtyp ATP13A2 führt zu einer kompletten Revertierung der mitochondrialen Fragmentierung ausgelöst durch α -Synuklein

oder A53T. Die Mitochondrien bilden wieder ein intaktes, tubuläres Mitochondriennetzwerk aus. Die Überexpression von ATP13A2 alleine hat hingegen keinen Einfluss auf die mitochondriale Morphologie (Abb. 4.16A/B). ATP13A2 kann, ähnlich wie die anderen autosomal rezessiv vererbten Parkinsonismus-assoziierten Gene, die mitochondriale Fragmentierung, ausgelöst durch α -Synuklein, revertieren.

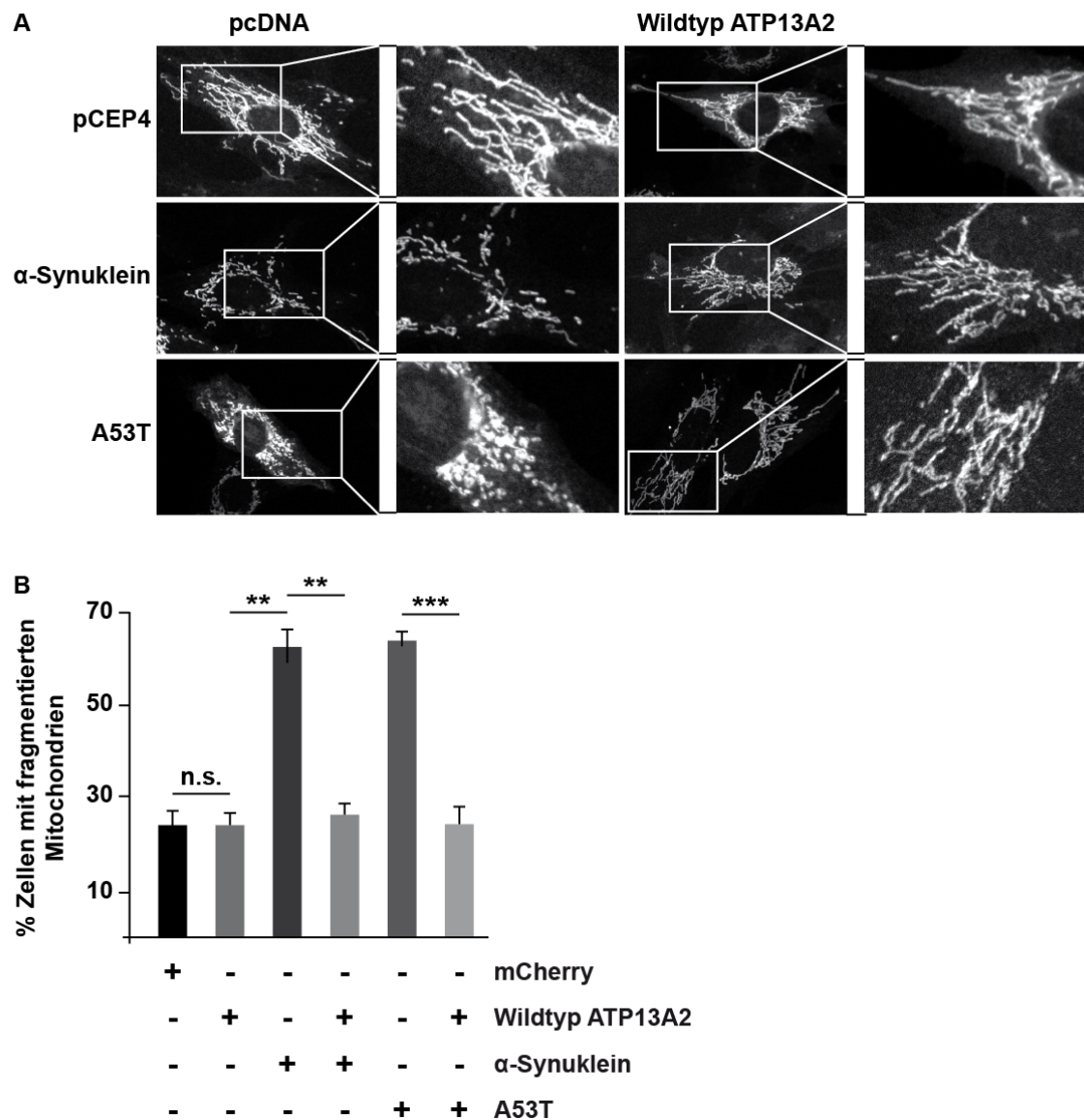


Abbildung 4.16 – Die durch α -Synuklein induzierte mitochondriale Fragmentierung kann durch Überexpression von ATP13A2 revertiert werden.

A) Nach transienter Transfektion von α -Synuklein, A53T, einer α -Synuklein-Mutante, und Wildtyp ATP13A2 oder den entsprechenden Kontrollen wurden die SH-SY5Y-Zellen fixiert und das mitochondriale Netzwerk durch Färbung von TOM20 sichtbar gemacht. Transfizierte Zellen wurden durch die Ko-Transfektion von mCherry markiert. B) Die Quantifizierung erfolgte durch Einteilung der Mitochondrien in die Gruppe “intakt“, sofern die Zelle ein intaktes mitochondriales Netzwerk mit tubulären Mitochondrien, die bis in die Ausläufer der Zellen reichten, aufwies. Zellen mit verkürzten Mitochondrien und mit fehlenden Ausläufern in die Zellperipherie wurden als “fragmentiert“ klassifiziert. Pro Bedingung wurden mindestens 300 Zellen ausgezählt. n=3, *** p<0,001 ** p<0,01.

4.2.3.4 Die PRKA wird durch ATP13A2 beeinflusst

Im Zusammenhang mit den Mitochondrien konnte eine weitere, interessante Beobachtung gemacht werden. Neben der mitochondrialen Morphologie nimmt ATP13A2 auch einen Einfluss auf Proteine, die für die mitochondriale Regulation verantwortlich sind. Die AMP-aktivierte Proteinkinase (PRKA) gilt als der “Energiesensor“ in der Zelle. Kommt es zu negativen Verschiebungen im energetischen Gleichgewicht der Zelle, aktiviert die PRKA katabole Prozesse und sorgt für einen Ausgleich des energetischen Defizits. Dabei nimmt sie auch Einfluss auf die Mitochondrien und die mitochondriale Biogenese. Die PRKA funktioniert als Heterotrimer, aufgebaut aus der katalytischen α -, der strukturegebenden β - und der regulatorischen γ -Untereinheit. Von allen Untereinheiten gibt es unterschiedliche Isoformen, die z.B. gewebespezifisch auftreten (Mihaylova and Shaw (2011); Oakhill et al. (2009)).

Die PRKA mRNA- und Proteinmengen wurden in ATP13A2 *Knockdown*-Zellen überprüft. Es wurden mRNA Mengen verschiedener PRKA-Untereinheiten untersucht. Bei einer *Knockdown*-Effizienz von über 80% zeigt sich für die PRKA-Untereinheit $\alpha 1$ und $\gamma 1$ eine leichte Reduktion der mRNA Menge um etwa 35 bzw. 20%. Die Untereinheit $\alpha 2$ zeigt hingegen keine Veränderung (Abb. 4.17A). Dieser Effekt ist nicht nur auf Ebene der mRNA zu beobachten, sondern auch auf Proteinebene. Im ATP13A2 *Knockdown* werden reduzierte Proteinmengen der α -Untereinheit im Vergleich zur Kontrolle detektiert. Dies setzt sich auch in der aktivierten, phosphorylierten Form der PRKA fort. Auch hier werden deutlich reduzierte Mengen im Vergleich zur Kontrolle detektiert (Abb. 4.17B). Durch geringere ATP13A2 Mengen kommt es auch zu einer Reduktion der PRKA Menge. Die PRKA kann ihrer Rolle als Energiesensor der Zelle Einfluss auf die Mitochondrien und die mitochondriale Biogenese nehmen. Dies bildet eine mögliche Verbindung zwischen ATP13A2 und den Mitochondrien.

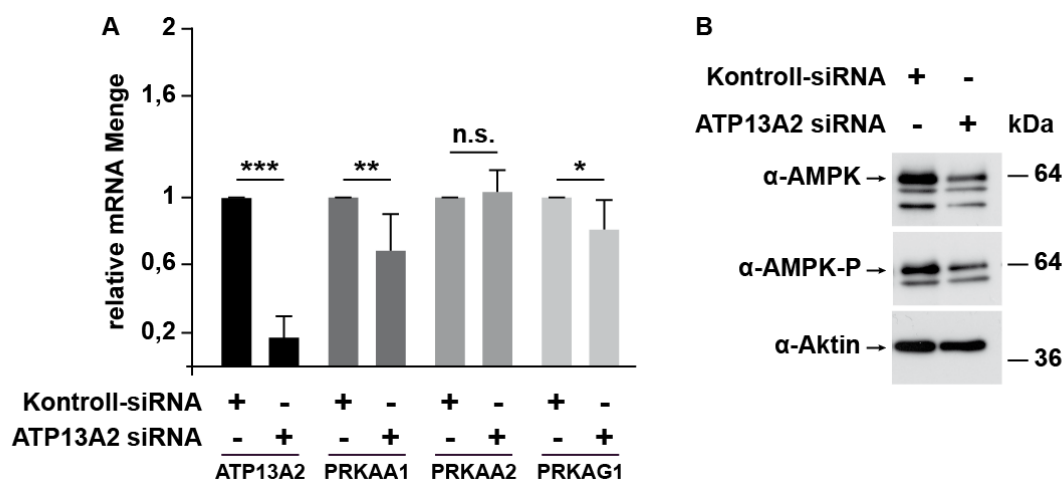


Abbildung 4.17 – Die PRKA Menge ist durch einen *Knockdown* von ATP13A2 beeinflusst. A) Eine Reduktion von ATP13A2 führt zu einer Reduktion der mRNA Menge verschiedener PRKA-Untereinheiten. Die mRNA Mengen von ATP13A2 *Knockdown*-Zellen wurden mittels RTPCR mit Primern gegen ATP13A2 und gegen die Untereinheiten $\alpha 1$ (= PRKAA1), $\alpha 2$ (= PRKAA2) und $\gamma 1$ (= PRKAG1) analysiert. $n=3$, *** $p<0,001$. ** $p<0,01$ * $p<0,05$. B) Auch die PRKA Proteinmengen sind durch einen *Knockdown* von ATP13A2 beeinflusst. Ein Duplikat der Proben, die für die RTPCR verwendet wurden, wurde mittels *Western Blot* unter Verwendung von Antikörpern gegen PRKA und die phosphorylierte Form der PRKA analysiert.

4.3 Regulation von *ATP13A2*

ATP13A2 weist ähnlich wie andere autosomal rezessiv vererbte, mit Parkinsonismus assoziierte Gene einen Einfluss auf das mitochondriale Netzwerk auf. Daher sollte nun untersucht werden, ob ATP13A2 auch bezüglich anderer Fragestellungen Ähnlichkeiten mit anderen autosomal rezessiv vererbten Parkinsonismus-assoziierten Genen in seinem Verhalten zeigt. Parkin beispielsweise ist ein Stress-protektives Protein (Bouman et al. (2010); Müller-Rischart et al. (2013)). Außerdem wird Parkin durch unterschiedlichen zellulären Stress induziert (Bouman et al. (2010)), ebenso wie PINK1 und DJ-1 (Bouman (2010)). Daher sollte überprüft werden, ob es sich auch im Falle von *ATP13A2* um ein Stress-induzierbares und Stress-protektives Gen handelt und somit eine weitere Gemeinsamkeit der autosomal rezessiv vererbten Gene.

4.3.1 Die Expression von *ATP13A2* wird durch zellulären Stress reguliert

Die Stress-Induzierbarkeit von *ATP13A2* sollte überprüft werden. Dabei wurden unterschiedliche Stressoren getestet, um zu überprüfen, ob nur bestimmte Signalwege zu einer Induktion von *ATP13A2* führen, oder ob es sich um eine generelle, Stress-bedingte Antwort der Zelle handelt. Außerdem wurde überprüft, ob diese Stress-bedingte Zell-Antwort auch in primären Zellen abläuft. Desweiteren wurden die für die Regulation verantwortlichen Transkriptionsfaktoren iden-

tifiziert und validiert.

4.3.1.1 Die Expression von *ATP13A2* wird in Säugerzellen durch unterschiedlichen zellulären Stress induziert

Zuerst sollte überprüft werden, ob es sich bei *ATP13A2* überhaupt um ein Stress-induzierbares Gen handelt. In einem ersten Versuch wurden SH-SY5Y-Zellen für 16 h mit unterschiedlichen Konzentrationen des ER-Toxins Thapsigargin behandelt. Thapsigargin inhibiert die Ca^{2+} -ATPase im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und führt zu einer Erhöhung der zytosolischen Kalzium-Konzentration (Lytton et al. (1991); Bouman et al. (2010)). Eine mögliche Induktion von *ATP13A2* wurde auf mRNA Ebene über RTPCR überprüft, da endogenes Protein nicht nachgewiesen werden konnte. Tatsächlich wird *ATP13A2* dosisabhängig durch Thapsigargin-Stress induziert. Die Behandlung mit geringen Thapsigargin-Konzentrationen ($1,25 \mu\text{M}$) induziert die *ATP13A2*-Transkription, so dass die doppelte Menge mRNA im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. Mit steigender Thapsigargin-Konzentration erhöht sich die nachgewiesene Menge *ATP13A2* mRNA (Abb. 4.18A).

Nach diesem ersten aussagekräftigen Ergebnis wurde die Versuchsreihe ausgebaut. Neben einem Inhibitor des ER wurden weitere Stressoren hinzugenommen. Epoxomycin inhibiert das Proteasom und verhindert somit den Abbau proteasomaler Substrate, was in der Zelle Stress auslöst (Meng et al. (1999); Minoru et al. (1992)). Ähnlich verhält es sich bei Bafilomycin, das allerdings das Lysosom und somit den lysosomalen Abbau inhibiert (Yoshimori et al. (1991)). Auch der Einfluss von mitochondrialem Stress, ausgelöst durch MPP^+ , wurde untersucht. MPP^+ , der aktive Metabolit von MPTP, hemmt Komplex I der Atmungskette (Markey et al. (1984)). Außerdem wurden Zellen gehungert, das heißt sie wurden in Medium ohne zusätzliche Nährstoffe oder Aminosäuren kultiviert. Einige Studien haben einen Zusammenhang zwischen Mn^{2+} -Ionen und *ATP13A2* entdeckt (Schmidt et al. (2009); Gitler et al. (2009)). Daher wurden die mRNA Mengen von *ATP13A2* auch nach einer Behandlung mit MnCl_2 untersucht. SH-SY5Y-Zellen wurden für 8, 16 und 24 h mit den unterschiedlichen Stressoren behandelt und die Induktion von *ATP13A2* über RTPCR überprüft. Die Konzentrationen wurden Vorversuchen, bzw. aus der Literatur übernommen und waren so gewählt, dass kein übermäßiger Zelltod zu beobachten war.

Alle Stressoren führen zu einer Stress-bedingten Induktion von *ATP13A2*, allerdings in deutlich unterschiedlichem Ausmaß. Epoxomycin führt bereits nach 8 h zu einer Verdopplung der nachgewiesenen mRNA Menge, nach 16 h ist ein konstantes Maximum erreicht. Ähnlich verhält sich dies für Thapsigargin und das Hungern der Zellen (Abb. 4.18B). Der stärkste Effekt wird durch MPP^+ erreicht. Es zeigt sich eine zeitabhängige Hochregulation bis hin zur Verachtfachung der mRNA Menge nach 48 h. Sehr viel geringer ist der erreichte Effekt durch Bafilomycin. Hier kommt es nur zu einer knappen Verdopplung der mRNA Menge, die allerdings signifikant ist (Abb. 4.18B). *ATP13A2* ist eindeutig ein Stress-induzierbares Gen, das auf verschiedene Arten von zellulären Stress reagiert. Am deutlichsten wird *ATP13A2* aber nach mitochondrialem Stress hochregu-

liert, was weiterhin für eine Verbindung zwischen ATP13A2 und den Mitochondrien spricht. Die Versuche wurden teils in Zusammenarbeit mit Vanessa Welk durchgeführt.

Allerdings ist nicht jeder Stress für eine Induktion von *ATP13A2* ausreichend. So führt eine Behandlung der Zellen mit Mn^{2+} zu keiner signifikanten Erhöhung der mRNA Menge (Abb. 4.18C). Eine höhere Mn^{2+} Konzentration konnte nicht angewendet werden, da sonst eine erhöhte Zellto- drate zu verzeichnen war.

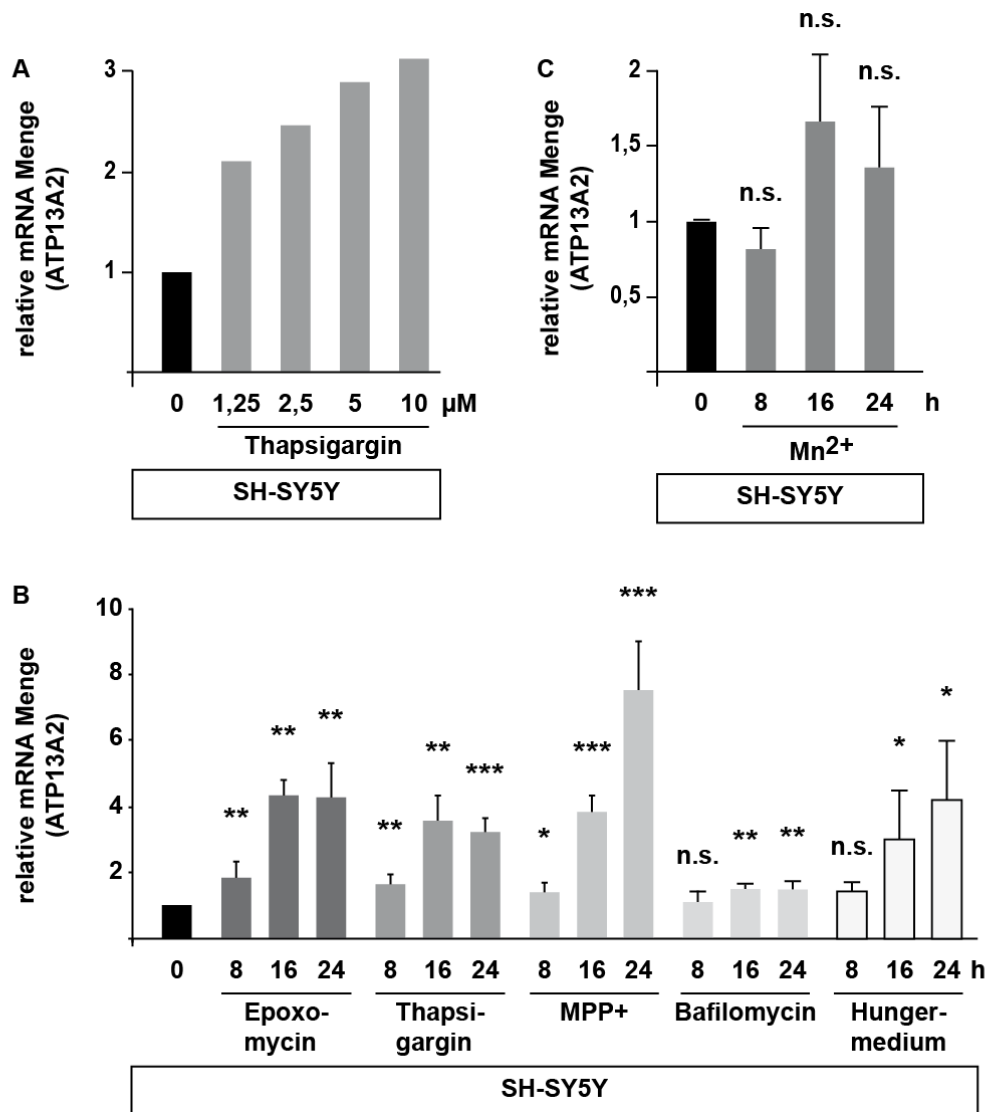


Abbildung 4.18 – *ATP13A2* wird durch unterschiedlichen zellulären Stress induziert.

A) Die Behandlung von SH-SY5Y-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen Thapsigargin führt zu einer dosisabhängigen Induktion von *ATP13A2*. SH-SY5Y-Zellen wurden für 16 h mit Thapsigargin in den angegebenen Konzentrationen behandelt und anschließend die mRNA Mengen mittels RTPCR analysiert. Gezeigt ist die Induktion bezogen auf die Kontrolle.

B) Die Behandlung von Zellen mit unterschiedlichen Stressoren führt zu einer Induktion von *ATP13A2*. SH-SY5Y-Zellen wurden für 8, 16 und 24 h mit 0,1 mM Epoxomycin, 5 μM Thapsigargin, 2 mM MPP+, 25 nM Bafilomycin oder Hungermedium behandelt und anschließend die mRNA Mengen mittels RTPCR analysiert. n=3, *** $p < 0,001$. ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$.

C) Nicht jeder Stressor führt zu einer signifikanten Induktion von *ATP13A2*, z. B. Mn^{2+} . SH-SY5Y-Zellen wurden mit 1 μM Mn^{2+} behandelt und anschließend die mRNA Mengen mittels RTPCR analysiert. n=3, n.s. $p > 0,05$.

4.3.1.2 Die Expression von *ATP13A2* wird auch in primären Zellen durch Stress induziert

Um sicherzugehen, dass es sich bei der Stress-Induktion von *ATP13A2* nicht um ein Phänomen in humanen, immortalisierten Krebszelllinien handelt, wurden primäre Zellen gestresst und die mRNA Mengen überprüft. Primäre Mausfibroblasten (MEF) von Wildtyp Mäusen wurden mit Thapsigargin für 8, 16 und 24 h gestresst und die mRNA Mengen über RTPCR bestimmt. Es zeigt sich eine über die Zeit stabile Induktion von *ATP13A2* (Abb. 4.19A).

Auch in primären Neuronen von Wildtyp Mäusen lässt sich Ähnliches beobachten. Durch die Behandlung mit Thapsigargin kommt es zu einer Detektion der etwa dreifachen Menge von *ATP13A2* mRNA im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4.19B). Die Stress-induzierte Regulation von *ATP13A2* ist also auch in primären, murinen Zellen nachweisbar. Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Vanessa Welk durchgeführt.

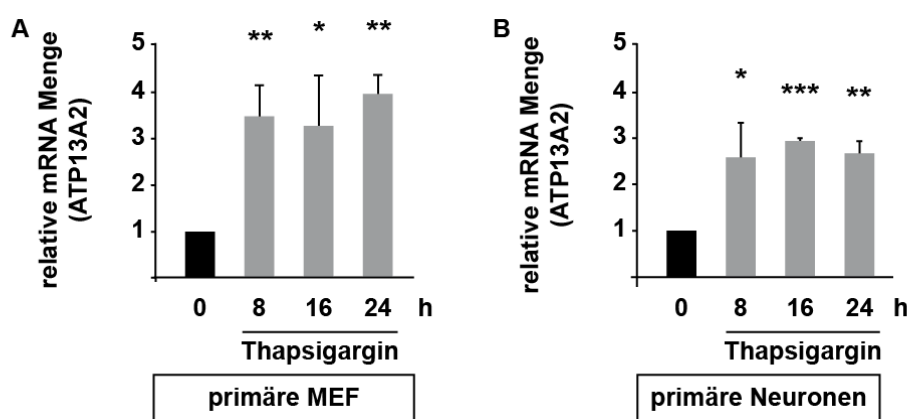


Abbildung 4.19 – *ATP13A2* wird durch zellulären Stress in primären Zellen induziert.

A) Die Behandlung von primären MEFs mit Thapsigargin führt zu einer Induktion von *ATP13A2*. Primäre MEFs wurden mit 5 μ M Thapsigargin für 8, 16 und 24 h behandelt und anschließend die mRNA Mengen mittels RTPCR analysiert. Gezeigt ist die Induktion bezogen auf die Kontrolle. n=3, ** p<0,01 * p<0,05. B) Die Behandlung von primären Neuronen mit Thapsigargin führt zu einer Induktion von *ATP13A2*. Primäre Neuronen wurden mit 5 μ M Thapsigargin für 8, 16 und 24 h behandelt und anschließend die mRNA Mengen mittels RTPCR analysiert. n=3, *** p<0,001 ** p<0,01 * p<0,05.

4.3.2 Bioinformatische Analyse des *ATP13A2* Promotors

Erhöhte mRNA Mengen können z.B. nach einer vermehrten Transkription des Gens nachgewiesen werden. Im Fall von *ATP13A2* ist der ursächliche Transkriptionsfaktor unbekannt. Daher analysierten wir den Promotor von *ATP13A2* nach möglichen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren und versuchten, diese im Anschluss zu validieren.

Die bioinformatische Analyse des Promotors von *ATP13A2* wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Dietrich Trümbach durchgeführt. Eine Analyse in verschiedenen Säugerarten ergab mut-

maßliche Bindestellen für unterschiedliche Transkriptionsfaktoren, u.a. für verschiedene Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren und für *Nuclear respiratory factor 1* (NRF1). Dabei waren v.a. die NRF1-Bindestellen von besonderem Interesse. Es wurden mehrere mutmaßliche, über verschiedene Spezies hinweg konservierte Bindestellen für diesen Transkriptionsfaktor identifiziert. Die Bindestellen zeichnen sich durch das Konsensusmotiv XX-[CT]-GCGC-XX-GCGC-XXX aus und liegen rund um die Transkriptionsstartstelle verteilt (Abb. 4.20). Dieser Fakt sowie die hohe Anzahl und die Konservierung in verschiedenen Säugetierspezies sprechen für einen hohen Relevanz von NRF1 als Transkriptionsfaktor von *ATP13A2*.

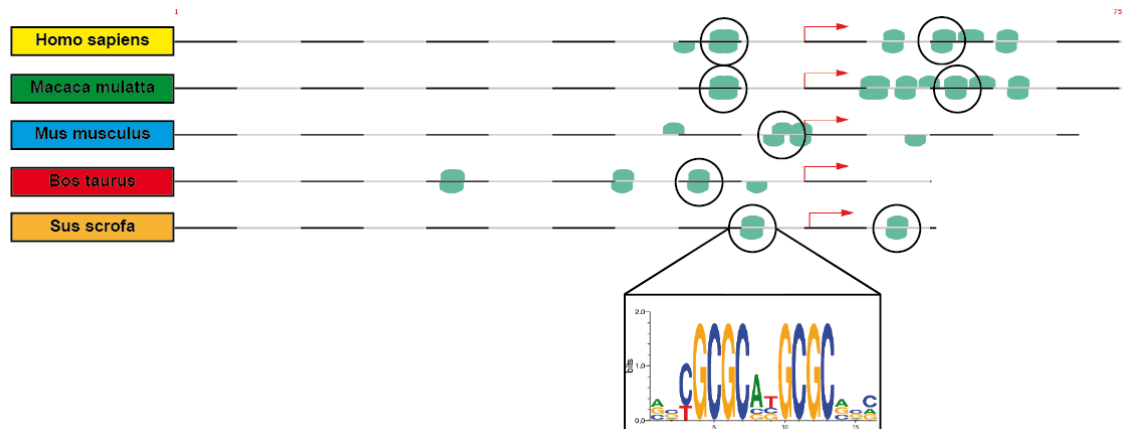


Abbildung 4.20 – Der Promotor von *ATP13A2* enthält Bindestellen für den Transkriptionsfaktor NRF1.

Analysiert wurden die Promotorregionen von *ATP13A2* in verschiedenen Säugetierspezies. In allen Spezies konnten zahlreiche NRF1 Bindestellen gefunden werden. Einige davon sind über die verschiedenen Spezies hinweg konserviert (eingekreist). Der rote Pfeil gibt die Transkriptions-Start-Stelle an. Das Konsensusmotiv der Bindestelle ist angegeben.

4.3.3 NRF1 ist ein Transkriptionsfaktor für *ATP13A2*

Um die tatsächliche Relevanz von NRF1 als Transkriptionsfaktor von *ATP13A2* nachzuweisen, wurden in einem ersten Schritt Luziferase-Reporter-*Assays* durchgeführt. Der Luziferase-Reporter-*Assay* beruht auf dem Prinzip, dass der Transkriptionsfaktor an den in einen Reporter-Vektor klonierten Promotor bindet und so zu einer Transkription des Reporter-Vektors führt. Somit wird das Luziferase-Gen im Reporter-Vektor abgelesen und Luziferase produziert. Die Luziferase wiederum setzt im anschließenden luminometrischen *Assay* sein Substrat Luziferin in einer Oxidationsreaktion zum Endprodukt Oxyluziferin um. Dabei entsteht Licht, das luminometrisch detektiert werden kann. Das bedeutet, je stärker der Promotor durch die Transkriptionsfaktoren aktiviert wird, umso stärker ist das Lichtsignal. Die Klonierungen und erste Versuche zu den Luziferase-Reporter-*Assays* wurden in Zusammenarbeit mit Vanessa Welk durchgeführt.

4.3.3.1 Klonierung eines Reporter-Luziferase-Konstrukts

Um diesen *Assay* durchführen zu können, wurde zuerst das Luziferase-Reporter-Konstrukt (Reporter-Konstrukt) kloniert. Hierfür wurden in den Ausgangsvektor pGL4.23 drei unterschiedlich lange ATP13A2-Promotorstücke eingesetzt. Der *ATP13A2* Promotor wurde aus genomischer DNA mittels spezifischer Primer amplifiziert, wobei sich die Stücke durch ihre N-terminale Länge vor der ersten mutmaßlichen NRF1 Bindestelle unterschieden. Konstrukt 1 zeichnet sich mit 257 Basen vor der ersten Bindestelle durch das längste Stück aus, Konstrukt 3 weist mit 143 Basen das kürzeste Stück auf (Abb. 4.21).

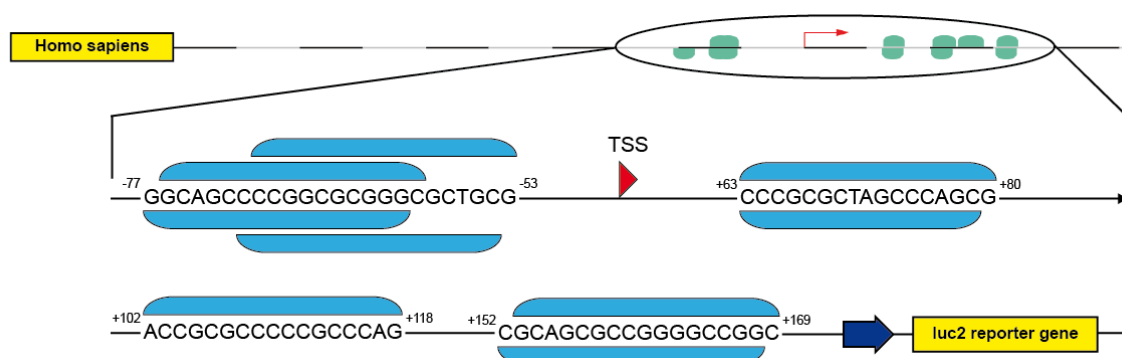


Abbildung 4.21 – Das ATP13A2 Reporter-Konstrukt enthält potenzielle NRF1 Bindestellen.

Basierend auf der Promotor-Analyse wurden drei Reporter-Konstrukte für den humanen *ATP13A2* Promotor kloniert, die sich in der Länge des N-Terminus unterscheiden. Diese beinhalten alle neun potenziellen NRF1 Bindestellen (blau) vor einer minimalen Promotor-Sequenz (blauer Pfeil) und dem Luziferase-Reporter-Gen (gelb).

4.3.3.2 Klonierung verschiedener NRF1-Konstrukte

Der zweite, unverzichtbare Teil für einen funktionierenden Luziferase-Reporter-*Assay* ist der Transkriptionsfaktor selbst. Es wurden drei verschiedene NRF1-Konstrukte kloniert, zwei Wildtyp-Konstrukte und eine inaktive Mutante. Wildtyp NRF1 wurde aus cDNA über spezifische Primer amplifiziert und in pcDNA3.1 (+), bzw. pcDNA6 V5/His (A), um eine *getaggte* Version zu erhalten, eingesetzt. Die mutierte NRF1 Variante, NRF1 DN 1-304 (NRF1 DN) enthält keine Transaktivierungs-Domäne mehr, da die Aminosäuren 304 bis 503 fehlen. Daher weist sie keine Aktivität mehr auf (Wu et al. (1999)). Sie wurde aus cDNA über spezifische Primer amplifiziert und in pcDNA6 V5/His (A) eingesetzt (Abb. 4.22A).

Die Expression und Nachweisbarkeit wurde für alle drei Konstrukte überprüft. SH-SY5Y-Zellen wurden mit den Konstrukten transfiziert und die Expression und Lokalisation überprüft. Auf Proteinebene können alle drei Konstrukte sowohl über einen spezifischen NRF1-Antikörper nachgewiesen werden, die *getagkten* Konstrukte auch über einen V5-Antikörper (Abb. 4.22B). In der Immunfluoreszenz werden alle drei Proteine detektiert und weisen zudem eine korrekte Lokalisa-

tion im Zellkern auf. Auch hier funktioniert sowohl der spezifische NRF1-Antikörper wie auch der gegen den *Tag* gerichtete V5-Antikörper zuverlässig (Abb. 4.22C). Die Expression und korrekte Lokalisation des Transkriptionsfaktors NRF1 ist somit sichergestellt.

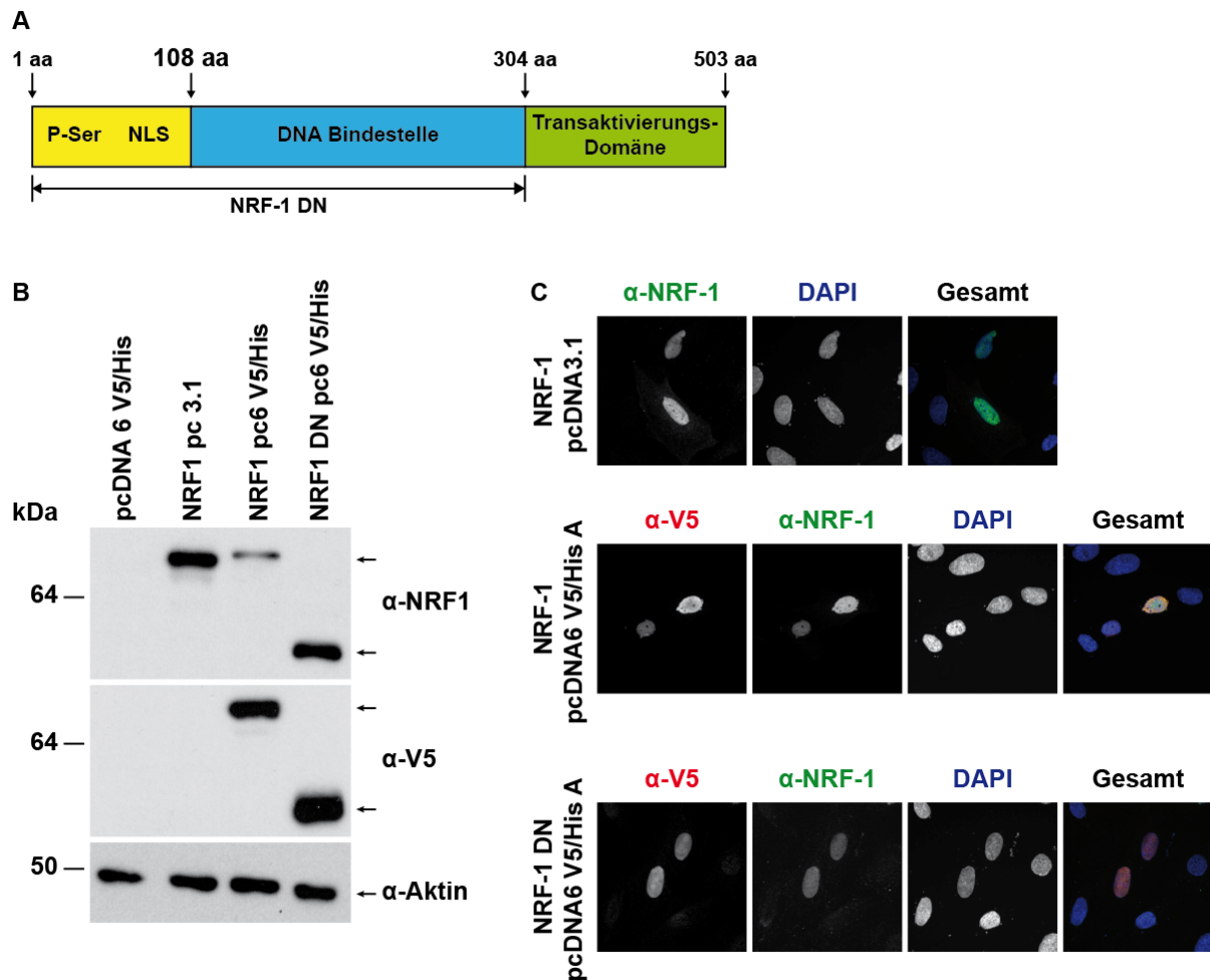


Abbildung 4.22 – Für die Luziferase-Reporter-*Assays* wurden Wildtyp NRF1 und eine inaktive NRF1 Mutante kloniert.

A) Schema der klonierten NRF1-Konstrukte. Wildtyp NRF1 enthält alle Strukturelemente. Für die Mutante NRF1 DN wurden die Aminosäuren 305-503 deletiert, somit fehlt die Transaktivierungsdomäne und das entstehende Protein ist inaktiv. B) Wildtyp NRF1 und die Mutante werden exprimiert. SH-SY5Y-Zellen wurden mit gleichen Mengen der drei klonierten Konstrukte NRF1 Wildtyp transfiziert. Die Proteinmengen wurden mittels *Western Blot* unter Verwendung von Antikörpern gegen NRF1 oder den V5-*Tag* des pcDNA 6 Vektors analysiert. C) Sowohl Wildtyp NRF1 als auch NRF1 DN sind im Kern lokalisiert. Es zeigt sich in der indirekten Immunfluoreszenz eine deutliche Kolo-kalisation zwischen dem V5-*Tag* bzw. der NRF1-Färbung und DAPI, das zur Anfärbung des Zellkerns verwendet wurde.

4.3.3.3 NRF1 induziert die Transkription des *ATP13A2* Promotors

Da nun alle entscheidenden Komponenten für den Luziferase-Reporter-*Assay* vorhanden waren, wurde in einem ersten Versuch überprüft, ob NRF1 den *ATP13A2* Promotor tatsächlich indu-

zieren kann. Dafür wurden HEK-Zellen mit den drei verschiedenen Reporter-Konstrukten sowie NRF1 transfiziert. Als Negativ-Kontrolle diente die Transfektion von GFP. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und die Luziferase-Aktivität luminometrisch durch den Umsatz von Luziferin zu Oxyluziferin und Licht vermessen. Wie sich deutlich zeigt, kann NRF1 die Transkription des ATP13A2 Promotors induzieren. Das längste Promotor-Stück (Prom1) zeigt dabei mit einer fast siebenfachen Induktion die stärkste Aktivität, die kürzeren Stücke (Prom2 und Prom3) reagieren etwas schwächer. Es scheinen also vor der ersten NRF1-Bindestelle noch Enhancer Elemente zu liegen, die die Transkription des Promotors verstärken (Abb. 4.23A).

Da das längste Promotor-Konstrukt den stärksten Effekt zeigte, wurde für die weiteren Versuche mit diesem Konstrukt weitergearbeitet. In einem zweiten Versuch sollte die nötige Menge an Transkriptionsfaktor besser austitriert werden. Die Transfektion von 0,25 μg NRF1 führt zu einer sehr starken Induktion des Promotors, daher wurde der gleiche Versuch parallel mit nur 0,1 μg NRF1 durchgeführt. Als Negativ-Kontrolle diente wiederum GFP. Durch die Transfektion von geringeren Mengen NRF1 wird tatsächlich auch eine geringere, aber immer noch sehr deutliche Transkription des ATP13A2 Promotors erreicht. Im Vergleich zu GFP liegt eine etwa vierfach höhere Aktivität vor (Abb. 4.23B). Die Dosisabhängigkeit des Signals von der transfizierten NRF1 Menge unterstreicht die Relevanz von NRF1 für die Regulation der Transkription von *ATP13A2*.

Diese Relevanz wurde weiterhin bestätigt. Die inaktive Mutante von NRF1, NRF1 DN, ist nicht mehr in der Lage die Transkription des Promotors von *ATP13A2* zu induzieren. NRF1 DN führt zu keiner signifikanten Erhöhung der Transkription des Promotors im Vergleich zur Negativ-Kontrolle GFP. Wildtyp NRF1 hingegen induziert den Promotor. Die gleichmäßige Expression beider NRF1-Konstrukte wurde durch die Kontrolle der Proteinmengen sichergestellt (Abb. 4.23B). Damit ist NRF1 als Transkriptionsfaktor von ATP13A2 bestätigt.

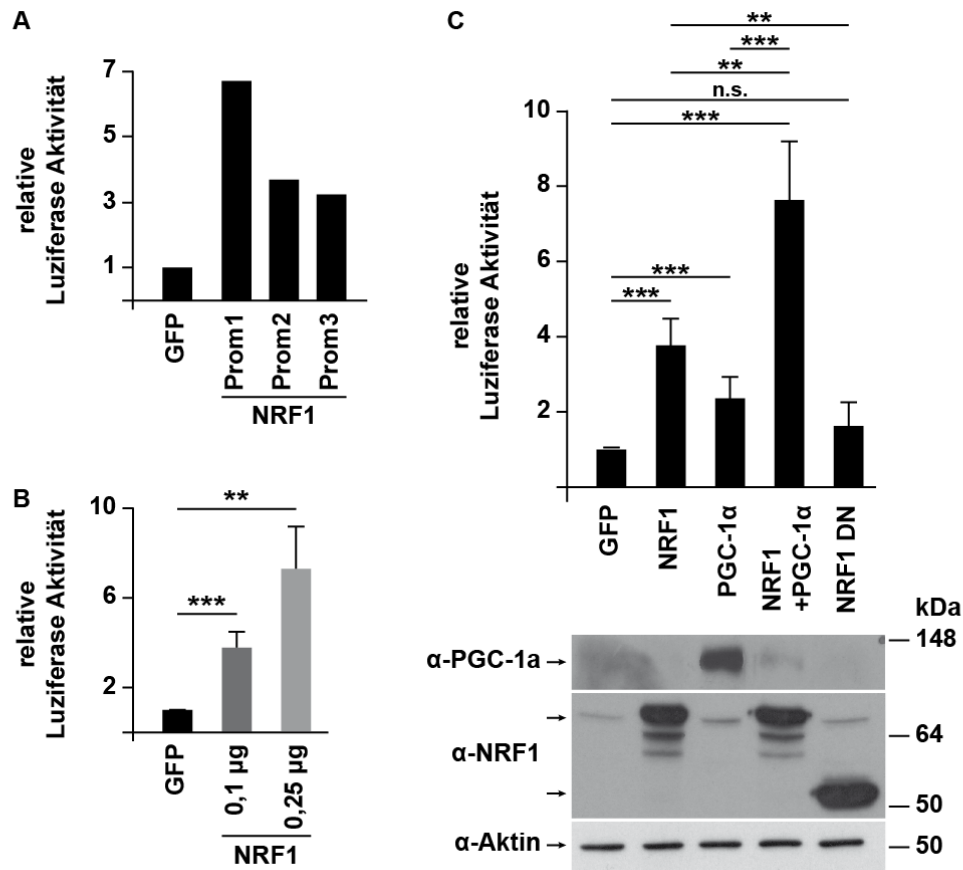


Abbildung 4.23 – Der Transkriptionsfaktor NRF1 induziert die Transkription des Promotors von *ATP13A2*.

A) Die Transkription aller drei *ATP13A2* Reporter-Konstrukte wird durch NRF1 induziert, wobei Prom1 die stärkste Aktivität zeigt. Die Luciferase-Aktivität der transfizierten HEK-Zellen wurde nach 24 h am Luminometer analysiert und das Signal auf die Proteinmengen der Proben normalisiert. Gezeigt ist die Induktion des Signals bezogen auf die Kontrolle. B) Die Transkription des *ATP13A2* Reporter-Konstrukts ist je nach eingesetzter Menge des Transkriptionsfaktors NRF1 dosis-abhängig und signifikant erhöht. HEK-Zellen wurden mit dem Reporter-Konstrukt Prom1 und mit 0,25 µg oder 0,1 µg NRF1 oder GFP als Kontrolle transfiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde wie in (A) beschrieben analysiert. n=3, *** p<0,001 ** p<0,01. C) Wildtyp NRF1 induziert die Transkription des *ATP13A2* Reporter-Konstrukts, seine inaktive Mutante NRF1 DN hingegen zeigt keine Aktivität (Balken 1, 2 und 5). Eine gleichmäßige Expression wurde durch Analyse der Proteinmengen mittels *Western Blot* sichergestellt. n=3, *** p<0,001 ** p<0,01.

4.3.3.4 NRF1 induziert die Expression von *ATP13A2* auf mRNA Ebene

Zur weiteren Bestätigung von NRF1 als Transkriptionsfaktor von *ATP13A2* wurden HEK-Zellen mit Wildtyp NRF1 transfiziert und die mRNA Mengen von *ATP13A2* analysiert. Ein Probenpaar wurde zusätzlich mit Thapsigargin behandelt. Dabei zeigte sich, vor allem unter Stress-Bedingungen, eine eindeutige Induktion der *ATP13A2* Mengen im Vergleich zur Kontrolle. Schon

unter ungestressten Bedingungen führt die Transfektion von NRF1 zu einer Induktion der Transkription von *ATP13A2*. Unter Stress wird dieser Effekt noch deutlicher (Abb. 4.24). Dies bestätigt die Rolle von NRF1 als Transkriptionsfaktor von *ATP13A2*.

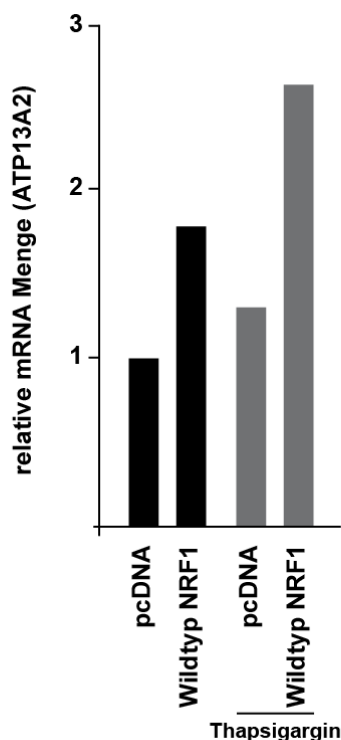


Abbildung 4.24 – Die Überexpression von NRF1 induziert die Transkription von *ATP13A2*. HEK-Zellen wurden mit Wildtyp NRF1 transfiziert und mit Thapsigargin behandelt. Die mRNA Mengen wurden mittels RTPCR analysiert. NRF1 induziert die Transkription von *ATP13A2*, so dass mehr mRNA nachgewiesen werden kann.

4.3.3.5 *NRF1* wird nach Stress im selben Maße reguliert wie *ATP13A2*

Ein weiterer Zusammenhang zwischen *ATP13A2* und *NRF1* zeigt sich bei der Stress-bedingten Induktion von *ATP13A2*. Untersucht man Proben aus der *ATP13A2*-Analyse mit *NRF1*-spezifischen Primern in der RTPCR, so ergibt sich ein sehr ähnliches Bild. *NRF1* wird durch Stress induziert, mit ähnlichen Verläufen wie bei *ATP13A2*. Durch die Behandlung der Zellen mit Epoxomycin kann man nach 16 h eine maximale Induktion von *NRF1* mit einer Verfünffachung der mRNA Menge nachweisen. Ähnlich verhält es sich für eine Behandlung mit Thapsigargin. MPP⁺ führt zur gleichen dosisabhängigen Induktion von *NRF1* wie man sie schon bei *ATP13A2* beobachten konnte (Abb. 4.25A).

Auch in primären Neuronen ist Ähnliches zu beobachten. Allerdings erhält man hier deutlicher erhöhte *NRF1* Mengen nach Thapsigargin-Stress als für *ATP13A2*. Bereits nach 8 h liegt die achtfache Menge von *NRF1* mRNA vor, nach 16 h ist mit der 15-fachen Menge ein Maximum

erreicht (Abb. 4.25B). Die Induktion von *NRF1* durch Stress könnte also die Induktion von *ATP13A2* erklären. Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Vanessa Welk durchgeführt.

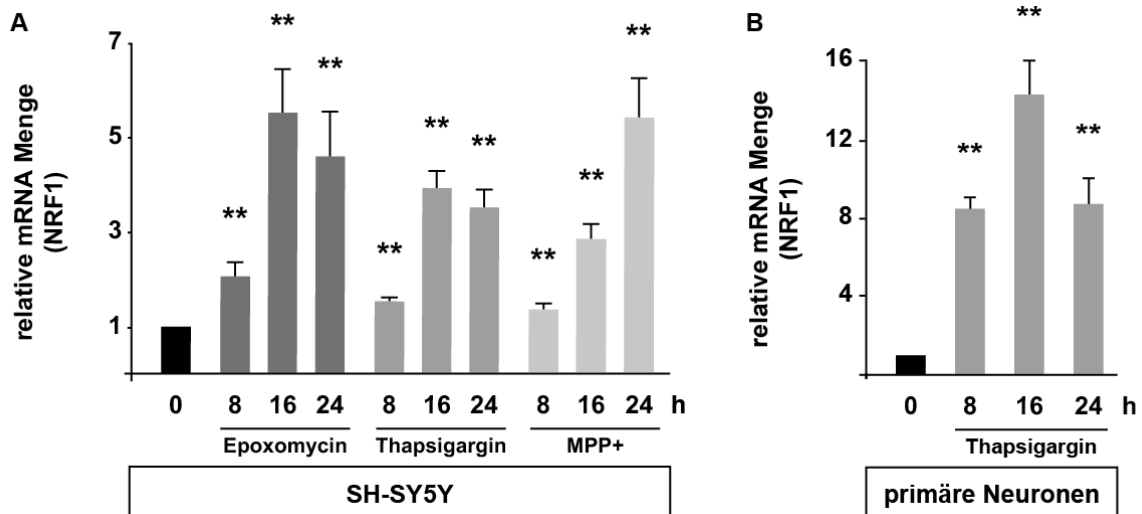


Abbildung 4.25 – NRF1 mRNA wird durch unterschiedlichen zellulären Stress induziert, ähnlich wie *ATP13A2*.

A) Die Behandlung von SH-SY5Y-Zellen mit unterschiedlichen Stressoren führt zu einer Induktion von *NRF1*. Die erneute Analyse der schon für die Induktion von *ATP13A2* verwendeten Proben mit *NRF1*-spezifischen Primern mittels RTPCR zeigt eine deutliche Induktion von *NRF1*. n=3, ** p< 0,01. B) Die Behandlung von primären Neuronen mit Thapsigargin führt zu einer Induktion von *NRF1*. n=3, ** p< 0,01.

4.3.4 PGC-1 α reguliert die Transkription von *ATP13A2*

4.3.4.1 PGC-1 α induziert die Transkription des *ATP13A2* Reporter-Konstrukts

Wir konnten zeigen, dass NRF1 als Transkriptionsfaktor die Expression von *ATP13A2* reguliert. NRF1 selbst steht in engem Zusammenhang mit *Peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 α* (PGC-1 α). PGC-1 α ist sowohl Koaktivator für den Transkriptionsfaktor NRF1, also auch Transkriptionsfaktor von NRF1 (Kelly and Scarpulla (2004); Wu et al. (1999)). Daher wurde untersucht, ob PGC-1 α Einfluss auf die Transkription des *ATP13A2* Promotors aufweist. HEK-Zellen wurden mit dem *ATP13A2* Reporter-Konstrukt und PGC-1 α oder NRF1+PGC-1 α transfiziert. Die Analyse erfolgte wie in Abb. 4.23. PGC-1 α induziert die Transkription des *ATP13A2* Reporter-Konstrukts um das etwa dreifache, PGC-1 α in Kombination mit NRF1 zeigt eine noch höhere Aktivität und führt zu einer achtfachen Induktion der Transkription. Die Expression wurde wieder durch die Analyse der Proteinmengen sichergestellt. Dabei zeigte sich eine gleichmäßige Expression der einzelnen Komponenten, die gleichzeitige Expression von NRF1 und PGC-1 α führt allerdings zu deutlich schwächeren PGC-1 α Mengen, was sich aber offensichtlich nicht in der Aktivierung des Promotors niederschlägt (Abb. 4.23). Neben NRF1 reguliert also

auch PGC-1 α die Transkription von *ATP13A2*. Da keine Bindestellen für PGC-1 α im Promotor von *ATP13A2* gefunden wurden, ist eine verstärkte Transkription des Promotors über das Zusammenspiel von PGC-1 α und dem *ATP13A2*-Transkriptionsfaktor NRF1 als Ursache für die regulatorische Aktivität von PGC-1 α denkbar.

4.3.4.2 PGC-1 α induziert *ATP13A2* auf mRNA Ebene

Zur weiteren Bestätigung der Rolle von PGC-1 α bzgl. der Transkription von *ATP13A2* wurden HEK-Zellen mit PGC-1 α transfiziert, ein Probenpaar zusätzlich mit Thapsigargin behandelt und die mRNA Mengen von *ATP13A2* analysiert. Auch PGC-1 α kann, vor allem unter Stress-Bedingungen, die Transkription von *ATP13A2* im Vergleich zur Kontrolle induzieren. Dabei zeigt sich ein ähnliches Bild wie für NRF1. Schon unter ungestressten Bedingungen führt PGC-1 α zu einer Induktion der Transkription von *ATP13A2* um, in gestressten Zellen wird dieser Effekt noch deutlicher (Abb. 4.26). Dies bestätigt die Rolle von PGC-1 α als zusätzlicher Regulator der Transkription von *ATP13A2*.

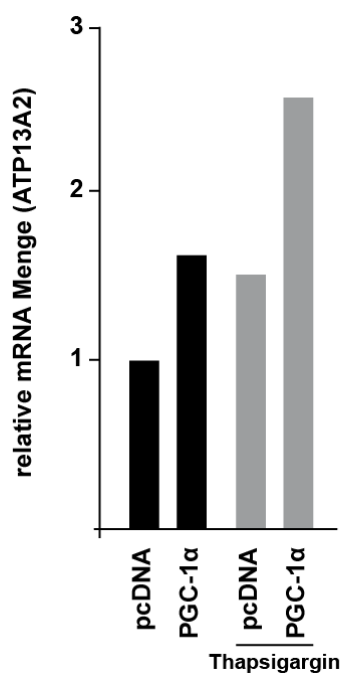


Abbildung 4.26 – Die Überexpression von PGC-1 α induziert die Transkription von *ATP13A2*.

HEK-Zellen wurden mit PGC-1 α transfiziert und ein Probenpaar mit Thapsigargin behandelt und anschließend mittels RTPCR analysiert. Gezeigt ist die Induktion bezogen auf die mit Leervektor transfizierte Kontrolle.

4.3.4.3 Ein Verlust von PGC-1 α hat Einfluss auf *ATP13A2*

Im Luziferase-Reporter-*Assay* konnte neben NRF1 auch PGC-1 α verantwortlich für die Regulation der Transkription von *ATP13A2* identifiziert werden. Neben der Überexpression der Transkrip-

tionsfaktoren sollte auch der Einfluss ihres Verlusts analysiert werden. Leider konnte kein erfolgreicher *Knockdown* von NRF1 etabliert werden, da die Zellen bei hohen *Knockdown*-Effizienzen abstarben. Da NRF1 und PGC-1 α aber in einem engen Wirkungszusammenhang stehen, sollte überprüft werden, ob ein PGC-1 α -*Knockdown* Einfluss auf *ATP13A2* hat. Um eine Kompensation des Verlusts von PGC-1 α vorzubeugen (Meirhaeghe et al. (2003)), wurden auch die Mengen des zur PGC-Familie gehörenden PGC-1 β reduziert. Dieser Versuch wurde in primären MEFs durchgeführt, da in kultivierten Zellen nur sehr geringe Mengen PGC enthalten sind und somit der Einfluss eines *Knockdowns* nicht feststellbar wäre.

Primäre MEFs wurden parallel mit PGC-1 α und PGC-1 β spezifischer siRNA transfiziert und die Zellen nach 72 h geerntet. Ein Probenpaar wurde zusätzlich mit Thapsigargin behandelt. In einem ersten Schritt wurde die *Knockdown*-Effizienz verifiziert. Der Doppel-*Knockdown* von PGC-1 α und PGC-1 β ist sehr robust mit einer *Knockdown*-Effizienz von etwa 80%. Zellulärer Stress führt zu einer deutlichen Induktion der Mengen von PGC-1 α und PGC-1 β (Abb. 4.27).

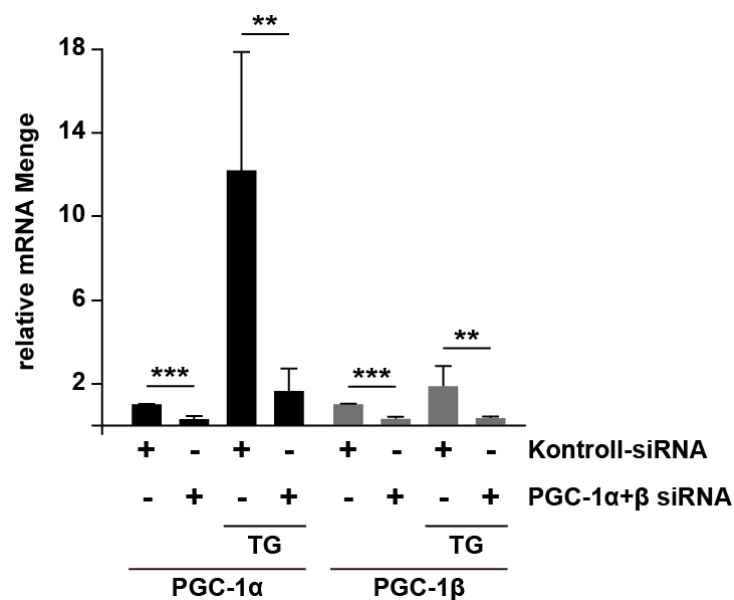


Abbildung 4.27 – Der *Knockdown* von PGC-1 α und PGC-1 β ist effizient.

Primäre MEFs wurden mit PGC-1 α und PGC-1 β -spezifischer siRNA transfiziert. Ein Probenpaar wurde zusätzlich mit Thapsigargin behandelt. Die mRNA Mengen wurden mittels RTPCR analysiert. Der *Knockdown* ist für beide Gene sehr effizient. n=3, *** p< 0,001 ** p<0,01.

4.3.4.3.1 Der PGC-1-*Knockdown* reduziert NRF1 Mengen

Da aus dem Zusammenhang zwischen NRF1 und PGC1- α zu vermuten ist, dass ein PGC-1 α / β -*Knockdown* Einfluss auf die mRNA Mengen von NRF1 hat, wurden diese überprüft. Tatsächlich zeigt sich ein Einfluss von PGC auf NRF. Die basalen Mengen von NRF1 sind im PGC-1 α / β -*Knockdown* leicht, allerdings nicht signifikant, erniedrigt. Nach Behandlung mit Thapsigargin

wird dieser Effekt deutlicher, es wird nur etwa halb so viel mRNA detektiert wie in der Kontrolle (Abb. 4.28). Geringere PGC-1 α und PGC-1 β -Mengen führen zu einer geringeren Transkription von *NRF1*, vor allem unter Stress-Bedingungen, was durch die Verknüpfung der beiden Transkriptionsfaktoren zu erklären ist.

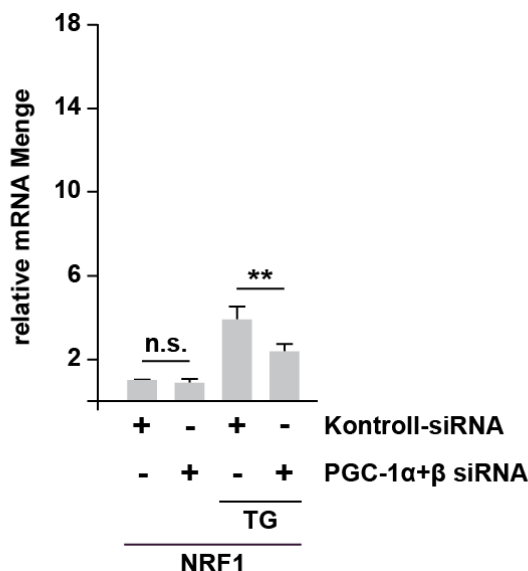


Abbildung 4.28 – Eine Reduktion von PGC-1 α und PGC-1 β reduziert die Mengen von *NRF1*.

Die Analyse der Proben aus Abb. 4.27 mit NRF1-spezifischen Primern zeigt verringerte *NRF1* Mengen, vor allem nach Behandlung mit Thapsigargin. n=3, ** p<0,01.

4.3.4.3.2 Der PGC-1-*Knockdown* reduziert ATP13A2 Mengen

Ein *Knockdown* von PGC-1 α und β bedingt eine Reduktion von NRF1. Dadurch sind beide regulierenden Transkriptionsfaktoren von ATP13A2 in geringerer Menge vorhanden. Um festzustellen, ob dies die Transkription von ATP13A2 beeinflusst, wurden die mRNA von ATP13A2 in den Proben aus Abb. 4.27 analysiert. ATP13A2 ist im Doppel-*Knockdown* von PGC-1 α und PGC-1 β um etwa 20% reduziert, nach Behandlung mit Thapsigargin ist dieser Unterschied noch deutlicher sichtbar (Abb. 4.29). Das bedeutet, dass verringerte Mengen von PGC-1 α und NRF1 die Transkription von *ATP13A2* beeinflussen. Eine Beteiligung des PGC-1 α - NRF1 - Signalwegs an der Regulation von *ATP13A2* wird somit bestätigt.

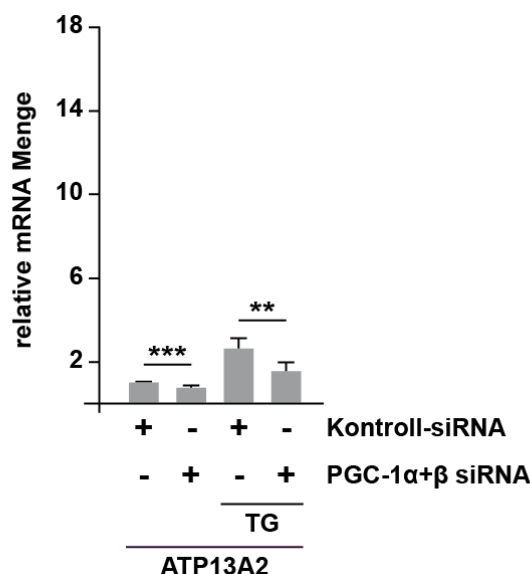


Abbildung 4.29 – Eine *Knockdown* von PGC-1 α und PGC-1 β beeinflusst die Mengen von ATP13A2.

Die Proben aus Abb. 4.27 wurden mit ATP13A2-spezifischen Primern in der RTPCR erneut untersucht. Der Verlust von PGC-1 α und die damit assoziierten verringerten NRF1 Mengen führen zu einer Reduktion von ATP13A2. n=3, *** p< 0,001 ** p<0,01.

4.4 ATP13A2 beeinflusst das Überleben von Zellen

Wir konnten beweisen, dass ATP13A2 ein Stress-induzierbares Protein ist, das über NRF1 und PGC-1 α reguliert wird. Durch die Induktion eines Proteins nach Stress werden oft andere zelluläre Signalwege induziert, die z.B. die Stress-Anfälligkeit der Zellen auf den jeweiligen Stressor regulieren. Parkin zeigt einen solchen Effekt (Müller-Rischart et al. (2013)). Die Behandlung von Zellen mit verschiedenen Stressoren führt zu einer Induktion der Parkin-Menge, was wiederum zur Aktivierung anti-apoptotischer Signalwege führt und somit zu einer zellprotektiven Wirkung von Parkin (Bouman et al. (2010); Müller-Rischart et al. (2013)). Da ATP13A2 bezüglich der Stress-Induzierbarkeit ähnliche Effekte wie Parkin aufzeigt, sollte analysiert werden, ob ATP13A2 Auswirkungen auf das Zellwachstum und eine zellprotektive Wirkung aufweist.

4.4.1 Eine Reduktion von ATP13A2 führt zu eingeschränktem Wachstum

Im Laufe der Etablierung des *Knockdowns* von ATP13A2 wurde bei der mikroskopischen Überprüfung der Zellen ein sichtbar langsames Wachstum der *Knockdown*-Zellen im Gegensatz zu den Kontrollen festgestellt. Um dies zu überprüfen, wurde eine Wachstumskurve der *Knockdown*-Zellen im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen angefertigt. SH-SY5Y-Zellen wurden revers mit siRNA transfiziert und in dünner Zellkonzentration ausplattiert, so dass auch nach 96 h Wachstumsdauer noch keine Konfluenz erreicht war. Nach 24, 48, 72 und 96 h wurden die

Zellen geerntet und über eine Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Das Wachstum der Zellen ist über die Zeit tatsächlich eingeschränkt. Nach 48 h zeigt sich eine um etwa 25 % reduzierte Zellzahl, nach 72 h ist das Wachstum um etwa 30 % reduziert. Nach 96 h ist dieser Effekt noch deutlicher mit einer etwa 40 %igen Reduktion (Abb. 4.30A). Der *Knockdown* ist über die verschiedenen Zeitpunkte hinweg effizient (Abb. 4.30B). Dass es sich dabei tatsächlich um verlangsamtes Wachstum handelt und nicht etwa um eine erhöhte Zelltod-Rate beweist die Analyse der Apoptose-Rate durch Färbung der aktiven Caspase-3 (Abb. 4.31). Es wird durch den *Knockdown* von ATP13A2 alleine kein erhöhter Zelltod im Vergleich zur Kontrolle analysiert. Ansonsten wiesen die Zellen keine lichtmikroskopisch sichtbaren Veränderungen auf.

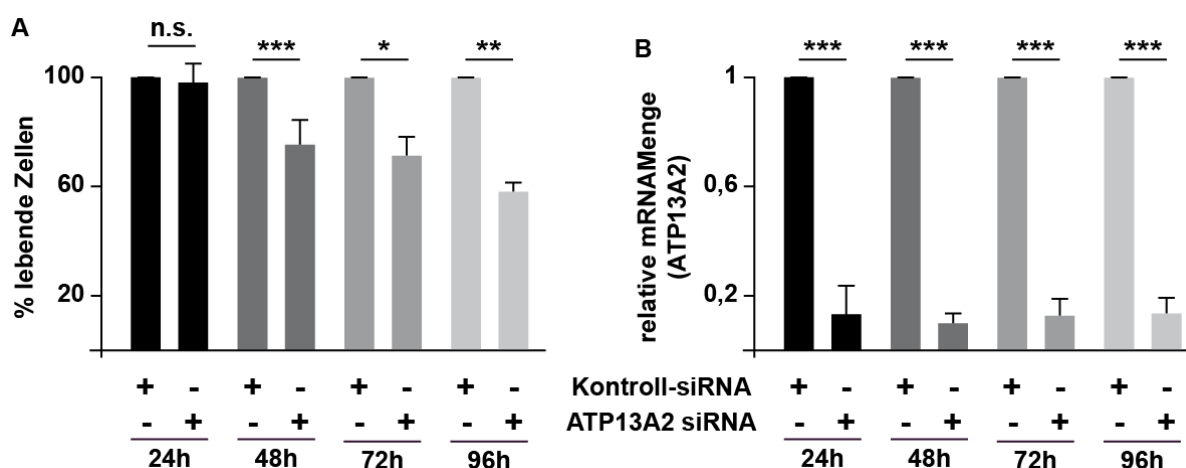


Abbildung 4.30 – Die Reduktion von ATP13A2 führt zu eingeschränktem Wachstum von SH-SY5Y-Zellen.

In SH-SY5Y-Zellen wurde ein ATP13A2 *Knockdown* durchgeführt. Nach 24, 48, 72 und 96 h wurde die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Gezeigt ist der Anteil lebender Zellen bezogen auf die Kontrolle. n=3, *** p<0,001 ** p<0,01 * p<0,05. B) Die *Knockdown*-Effizienz wurde mittels RT-PCR wie in Fig. 4.9 überprüft. n=3, *** p<0,001.

4.4.2 Eine Reduktion der ATP13A2 Mengen macht Zellen anfälliger gegen Stress

Um zu überprüfen, ob es sich im ATP13A2 *Knockdown* tatsächlich um reduziertes Wachstum und nicht um erhöhten Zelltod handelt, wurde die Apoptoserate in den *Knockdown* Zellen überprüft. Um gleichzeitig erste Rückschlüsse auf das protektive Potential des Proteins ziehen zu können, wurde außerdem die Apoptoserate nach Induktion von Apoptose durch Staurosporin analysiert. Diese Versuche wurden von Vanessa Welk durchgeführt. SH-SY5Y-Zellen wurden mit ATP13A2-spezifischer siRNA transfiziert und ein Probenpaar mit Staurosporin gestresst. Staurosporin ist ein allgemeiner Kinase-Inhibitor und löst sehr potent Apoptose aus (Rüegg and Gillian (1989); Müller-Rischart et al. (2013)). Die Analyse der Zellen erfolgte über indirekte Immunfluoreszenz. Aktive Caspase-3, ein Marker für Apoptose, wurde gefärbt und Caspase-positive Zellen am Mikroskop ausgezählt. Ein *Knockdown* von ATP13A2 alleine zeigt keinen Einfluss auf Apoptose.

Die Menge von aktiver Caspase-3 sind nicht signifikant erhöht. Durch die Behandlung der Zellen mit Staurosporin wird Apoptose induziert. Die Apoptose-Rate im ATP13A2-*Knockdown* ist im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht (Abb. 4.31A). Die *Knockdown*-Effizienz wurde mittels RTPCR sichergestellt (Abb. 4.31B). Der Verlust von ATP13A2 macht Zellen anfälliger gegen Stress-induzierten Zelltod und gibt einen ersten Hinweis, dass ATP13A2 tatsächlich ein zellprotektives Potential besitzt.

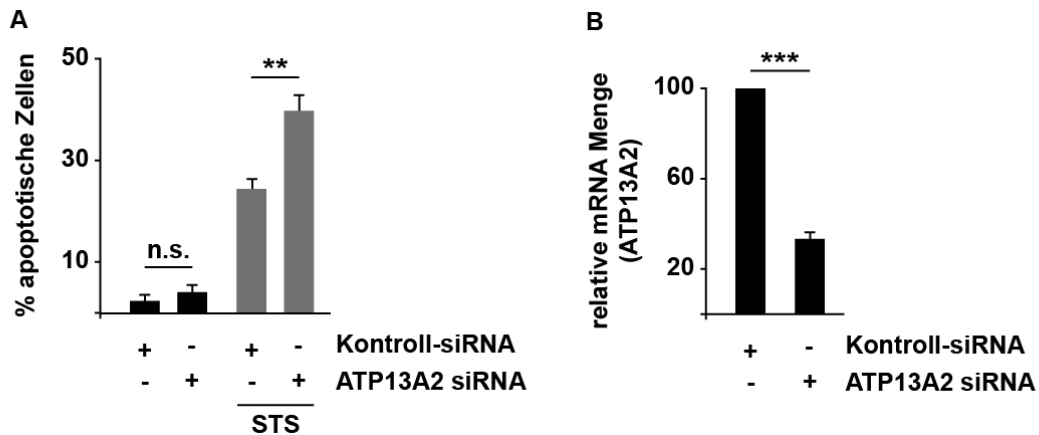


Abbildung 4.31 – Ein *Knockdown* von ATP13A2 führt zu erhöhter Anfälligkeit gegenüber zellulärem Stress.

A) In SH-SY5Y-Zellen wurde ATP13A2 über siRNA herunter reguliert. Apoptose wurde durch die Behandlung mit Staurosporin induziert. Die Analyse der Apoptoserate erfolgte über die Färbung von aktive Caspase-3, einem Apoptose-Marker, durch indirekte Immunfluoreszenz. Pro Bedingung wurden mindestens 300 Zellen ausgezählt. n=3, ** p<0,01. B) Die *Knockdown*-Effizienz wurde mittels RTPCR überprüft. n=3, *** p<0,001.

4.4.3 Höhere ATP13A2 Mengen schützen vor Stress-induzierter Apoptose

Um das zellprotektive Potential von ATP13A2 zu bestätigen, wurde der Einfluss von erhöhten ATP13A2 Mengen auf Stress-induzierte Apoptose untersucht. Diese Versuche wurden von Vanessa Welk durchgeführt. SH-SY5Y-Zellen wurden mit Wildtyp ATP13A2 transfiziert und mit Staurosporin gestresst. Transfizierte Zellen wurden durch eine Ko-Transfektion mit EYFP markiert. Die Analyse erfolgte über eine Auszählung von transfizierten, aktive Caspase-3 positiven Zellen. Wildtyp ATP13A2 hat basal keinen Einfluss auf die Caspase-Aktivität, der Wert zeigt keinen Unterschied zur Kontrolle auf. Unter Stress-Bedingungen allerdings sind unter erhöhten ATP13A2 Mengen etwa 50% weniger Zellen apoptotisch als in den Kontroll-Zellen (Abb. 4.32A). Eine gleichmäßige Proteinexpression wurde durch Überprüfung der Proteinmengen mittels *Western Blot* sichergestellt (Abb. 4.32B). Es zeigt sich sehr deutlich, dass ATP13A2 Stress-induzierte Apoptose reduzieren kann. ATP13A2 besitzt somit eindeutig zellprotektive Eigenschaften.

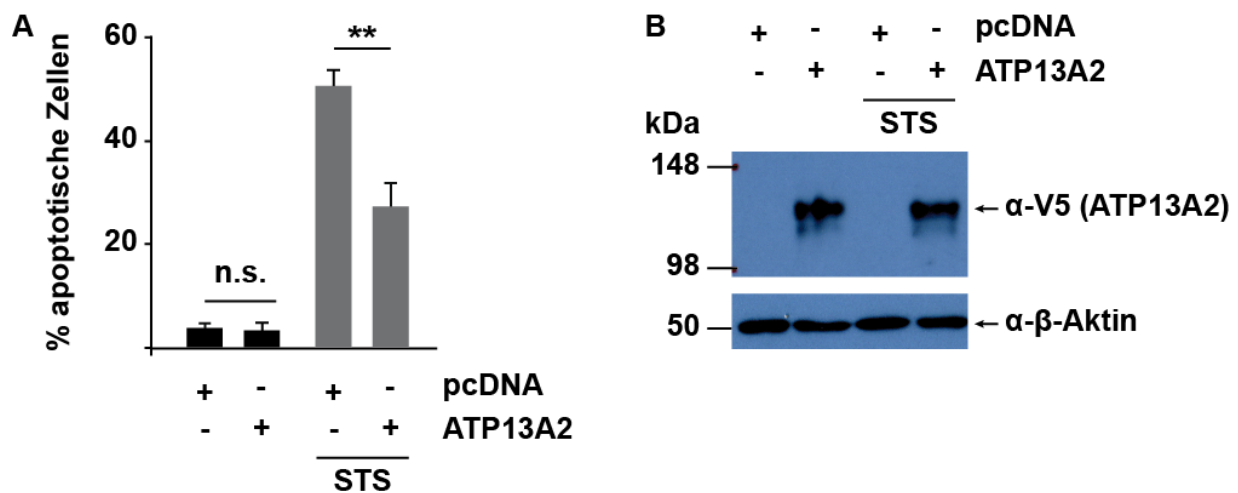


Abbildung 4.32 – Höhere ATP13A2 Mengen schützen die Zellen vor Stress-induzierter Apoptose.

A) SH-SY5Y-Zellen wurden transient mit Wildtyp ATP13A2 transfiziert, als Transfektionskontrolle wurde EYFP hinzu transfiziert. Ein Probenpaar wurde mit Staurosporin gestresst. Die Analyse erfolgte über die Färbung der aktiven Caspase-3, einem Apoptose-Marker. Pro Bedingung wurden mindestens 300 Zellen ausgezählt. n=3, ** $p < 0,01$. B) Eine gleichmäßige Expression von ATP13A2 wurde durch Analyse der Proteinmengen mittels *Western Blot* sichergestellt. n=3, ** $p < 0,01$.

5 Diskussion

Mutationen in ATP13A2, einer Typ V P-Typ ATPase, sind verantwortlich für das Kufor-Rakeb-Syndrom (KRS), einem Parkinson+ Syndrom mit Krankheitsbeginn bereits im jugendlichen Alter (Ramirez et al. (2006)). In von KRS betroffenen Familien konnten unterschiedliche homozygote oder *compound*-heterozygote Mutationen identifiziert werden, die zu stark trunkierten Proteinen oder auch zu *Missense*-Mutationen in den Proteinen führen. Heterozygote ATP13A2 Mutationen konnten auch mit Morbus Parkinson assoziiert werden. Interessanterweise führen homozygoten Mutationen zu einem Krankheitsbeginn bereits im jugendlichen Alter, wohingegen heterozygote Mutationen zu einem späteren Krankheitsbeginn führen (<50 Jahren) (Ramirez et al. (2006); Di Fonzo et al. (2007); Ning et al. (2008); Schneider et al. (2010); Paisán-Ruiz et al. (2010); Park et al. (2011); Santoro et al. (2011); Crosiers et al. (2011); Eiberg et al. (2012); Djarmati et al. (2009); Chen et al. (2011); Fong et al. (2011); Lin et al. (2008); Fei et al. (2010); Chan et al. (2010)) (Tab. 3.1/3.3). Es scheint also eine gewisse Genotyp-Phänotyp Korrelation zwischen dem Grad der Schwere der Mutation und dem Ausbruch und der Schwere der Krankheit zu bestehen.

ATP13A2 ist als monogenetische Ursache für Parkinsonismus bestätigt und unter dem Genlocus PARK9 bekannt. Die genauen Ursachen, die zu Parkinsonismus führen, sind bis heute nicht bekannt. Untersuchungen der mit Parkinsonismus assoziierten Gene bieten aber eine gute Chance diesen Ursachen näher zu kommen. Da sich die Pathologie der vererbten Parkinsonismus-Fälle mit der des idiopathischen Morbus Parkinson sehr deutlich überschneidet, stellen vererbte Fälle ein gutes Modell dar, die zugrunde liegenden Pathomechanismen zu untersuchen. Gelingt es, die Signalwege zu entschlüsseln, die durch Mutationen in diesen Genen betroffen sind, können Rückschlüsse auch auf den idiopathischen Morbus Parkinson gezogen werden. Die Erforschung von ATP13A2 fügt dem bisher unvollständigen "Puzzle" der Ursachen von Parkinsonismus neue Teile hinzu und hilft, das Bild zu vervollständigen. Es ist entscheidend, ein genaueres Verständnis für die Krankheit Parkinsonismus zu entwickeln und in seiner Folge ursächlich wirksame Medikamenten zu entwickeln.

ATPase erhalten im Allgemeinen eine Ionengradienten unter ATP-Verbrauch über zelluläre Membranen hinweg. Über die genaue Funktion der Typ V P-Typ ATPasen ist nicht viel bekannt (Kühlbrandt (2004)). Bisher kennt man weder das Substrat, das von dieser ATPase transportiert wird, noch weiß man Genaues über die Funktionsweise bzw. die Auswirkungen der Mutationen auf die Funktion von ATP13A2. Daher sollte in dieser Arbeit mittels eines *Knockdown*-Modells der Funktionsverlust der Mutanten imitiert und die beeinflussten Signalwege untersucht werden, um Rückschlüsse auf eine Funktion von ATP13A2 ziehen zu können. Ebenso wurde die transkriptionelle Regulation von ATP13A2 untersucht.

5.1 Funktionelle Charakterisierung von ATP13A2

5.1.1 Die Struktur von ATP13A2 gibt Hinweise auf seine Funktion

Zu Beginn der Arbeit war wenig über das Protein ATP13A2 bekannt. Daher wurden in einem ersten Teil biochemische und funktionelle Charakteristika des Proteins untersucht. Eine erste wichtige Information über das Protein kann man aus seiner Struktur und seiner Lokalisation gewinnen.

Für Wildtyp ATP13A2 konnte bisher eine Lokalisation in der lysosomalen Membran und in der Membran anderer saurer Vesikel, hauptsächlich frühen und späten Endosomen, nachgewiesen werden (Ramirez et al. (2006); Podhajska et al. (2012)). Diese Lokalisation konnten wir bestätigen, ebenso wie eine Fehllokalisierung der mit KRS assoziierten Mutanten delC, i16 und S13 (Abb. 4.2). Sie wiesen eine netzwerkartige Struktur auf, die sich mit der beschriebenen Fehllokalisierung der Mutanten im endoplasmatischen Retikulum (ER) deckt (Ramirez et al. (2006); Ramonet et al. (2012); Tan et al. (2011); Ugolino et al. (2011); Covy et al. (2012); Podhajska et al. (2012)). Dies wurde durch ihr Abbauverhalten bestätigt. Der Wildtyp von ATP13A2 akkumulierte eindeutig nach lysosomaler Inhibition, wobei die Mutanten nur nach proteasomaler Inhibition stabilisiert und detektiert wurden (Abb. 4.4). Die Mutationen greifen massiv in die Proteinstruktur von ATP13A2 ein und führen zu vorzeitigen Stop-Coden, die eine Trunkierung des Proteins zur Folge haben (Abb. 4.1). Die strukturellen Veränderungen verhindern, dass die mutierten Proteine das ER verlassen und führen zu einem raschen Abbau über das Proteasom. Ugolino *et al.* konnten zeigen, dass ATP13A2 tatsächlich ubiquitiniert wurde und die Mutanten über ER-assoziierte Degradierung (ERAD) abgebaut wurden (Ugolino et al. (2011)).

Die durch die Mutationen delC, i16 und S13 verursachten Trunkierungen betreffen sehr große Stücke des Proteins, d.h. es fehlen ganze Teile der Transmembrandomänen (Abb. 4.1). Wir konnten nachweisen, dass schon geringere Veränderungen der Proteinstruktur ausreichen, um eine Fehllokalisierung und einen Abbau der Mutanten zu erreichen. Eine Deletion von 72 Basen des N-Terminus oder 66 Basen des C-Terminus reichte aus, um eine netzwerkartige Lokalisation und einen Abbau über das Proteasom zu begünstigen (Abb. 4.6). Im N- bzw. C-Terminus des Proteins scheinen sich wichtige Strukturelemente zu befinden, deren Fehlen zu einer entscheidenden Fehlfaltung oder einem Funktionsverlust der Mutanten und in Folge dessen zu deren Abbau führt. Interessanterweise konnte bei einem Morbus Parkinson Patienten mit frühem Ausbruch der Krankheit (30 Jahre) eine heterozygot vererbte Mutation gefunden werden, bei der im N-Terminus von ATP13A2 die zwölfte Aminosäure von Threonin zu Methionin (Thr12Met) mutiert ist (Di Fonzo et al. (2007)). Diese Mutation Thr12Met führt an Position 12 des Proteins ein neues Start-Codon ein und könnte so eine Deletion des N-Terminus nach sich ziehen. Eine Deletion des N-Terminus von ATP13A2 kann also in Verbindung mit dem Ausbruch von Morbus Parkinson

gebracht werden. Zusammen mit den von uns beobachteten Effekten einer Fehllokalisierung des Proteins nach Deletion des N- bzw. C-Terminus bekräftigt dies die Annahme, dass sich im N- und C-Terminus funktionell wichtige Strukturelemente des Proteins befinden.

Über die Struktur des Proteins gibt es bisher keine experimentellen Ergebnisse. Unsere computerbasierte Analyse über ch.embnet.org ergab für ATP13A2 zehn Transmembrandomänen, wobei sowohl der N- als auch der C-Terminus im Zytosol liegen (ch.embnet.org) (Abb. 3.1). Damit deckt sich unsere Strukturvorhersage mit den bisher vielfach in der Literatur beschriebenen Vorhersagen für ATP13A2 (Ramirez et al. (2006); Podhajska et al. (2012); Covy et al. (2012); Park et al. (2011)). Darüber hinaus entsprechen zehn Transmembrandomänen mit zytosolischem N- und C-Terminus und die molekulare Masse den klassischen, strukturellen Kennzeichen einer P-Typ ATPase (Kühlbrandt (2004); Palmgren and Nissen (2011)). Ebenso finden sich die für die Funktion der P-Typ ATPase wichtigen, konservierten Domänen der Phosphorylierungsdomäne (P-Domäne), der Nukleotidbindedomäne (N-Domäne) und der Aktuatordomäne (A-Domäne) wieder (Abb. 3.1).

P-Typ ATPase transportieren unter ATP-Verbrauch Ionen über Membranen hinweg. Der genaue Funktionsmechanismus wurde bereits in der Einleitung dargelegt. Auf Grund von Substratspezifitäten können P-Typ ATPase in fünf Gruppen eingeteilt werden, die oft in weitere Subgruppen aufgespalten sind. P-Typ ATPasen erfüllen sehr unterschiedliche Funktionen, in dem sie unterschiedliche Substrate transportieren und in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisiert sind. Neben dem Transport von ein- und zweiwertigen Ionen, z.B. H^+ , K^+ oder Ca^{2+} sind auch Schwermetallionen wie Pb^{2+} , Zn^{2+} oder Cu^{2+} beschriebene Substrate von P-Typ ATPasen (Palmgren and Nissen (2011)). Für die spezifische Funktion sind aber nicht nur unterschiedliche Substrate entscheidend. Auch die Lokalisation der ATPase spielt eine entscheidende Rolle. Die Typ IB ATPase ATP7 beispielsweise kann in zwei weitere Subtypen unterschieden werden, die unterschiedlich lokalisiert sind. Beide Subtypen transportieren Cu^{2+} Ionen. Bei einer Fehlfunktion führen sie aber auf Grund ihrer unterschiedlichen Lokalisation zu zwei unterschiedlichen Kupferstoffwechselstörungen. Das Menkes-Syndrom ist durch Mutationen der ATPase ATP7A bedingt (MENKES et al. (1962); Vulpe et al. (1993)), Morbus Wilson hingegen wird durch Mutationen in ATP7B ausgelöst (Ala et al. (2007) ; Tanzi et al. (1993)). Durch die Identifizierung der Lokalisation und des transportierten Substrats einer ATPase kann man also auf ihre Funktion und auf beeinflusste Signalwege schließen. Das Substrat von ATP13A2 ist bislang nicht bekannt, eine Identifizierung könnte aber zur Aufklärung des Krankheitsmechanismus beitragen. Durch Experimente in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) und Säugerzellen versuchte man, das Substrat von ATP13A2 zu entschlüsseln, kam bisher aber zu unterschiedlichen Ergebnissen. In Experimenten mit *Ypk9*-defizienten Hefe-Stämmen, dem Ortholog von *ATP13A2*, wurde eine erhöhte Sensitivität der Hefe gegenüber Schwermetallionen festgestellt. Schmidt *et. al* stellten eine erhöhte Sensitivität der *Ypk9*-defizienten Hefe-Stämme gegenüber Cd^{2+} , Ni^{2+} , Se^{2+} und Mn^{2+} fest und schlossen daraus, dass *Ypk9* an der Aufnahme von zweiwertigen Schwermetallionen beteiligt ist (Schmidt et al. (2009)). Gitler *et. al* hingegen stellten eine Sensitivität der *Ypk9*-defizienten Hefe-

Stämme nur gegenüber Mn^{2+} fest (Gitler et al. (2009)). Eine protektive Wirkung von ATP13A2 gegenüber Mn^{2+} - induziertem Zelltod und eine regulierende Wirkung von ATP13A2 bzgl. der Mangan-Homöostase in der Zelle konnte auch in Säugerzellen festgestellt werden (Tan et al. (2011)). Andere Arbeitsgruppen konnten für ATP13A2 hingegen keine protektive Wirkung von ATP13A2 gegenüber einer Mangan-Toxizität finden (Pinto et al. (2012)). Neueste Studien bringen ATP13A2 mit der Regulation der Zink-Homöostase in Säugerzellen in Verbindung. In Folge der dysregulierten Zink-Homöostase zeigten sich sowohl lysosomale als auch mitochondriale Schädigungen, die durch ATP13A2 revertiert werden konnten (Tsunemi and Krainc (2013); Park et al. (2014); Kong et al. (2014)).

Auf Grund der teils widersprüchlichen Ergebnisse könnte z.B. eine Analyse der Ionenströme mittels *Patch Clamp* genaueren Aufschluss über die von ATP13A2 transportierten Ionen liefern. Eine Analyse intrazellulärer, kleiner Organelle, wie sie die Lysosomen darstellen, gestaltet sich jedoch schwierig. Lösungsansätze für dieses Problem könnte die Anwendung einer speziellen Technik, dem *planar patch clamp approach* (Schieder et al. (2011)) sein, oder eine Manipulation des Proteins, so dass es sich in die Plasmamembran der Zelle anstatt in die lysosomale Membran integriert. Eine Identifizierung der lysosomalen Signalsequenz, die ATP13A2 zum Lysosom dirigiert, war bisher noch nicht erfolgreich. Eine Modifizierung der von uns identifizierten Sequenz änderte die Lokalisation des Proteins nicht. Eine Deletion von N- oder C-Terminus, um mögliche weitere Lokalisierungs-Elemente zu entfernen, führt wie oben beschrieben zum Abbau der Mutanten. Weitere Untersuchungen des Proteins bezüglich seiner lysosomalen Signalsequenz oder aber die Fusion von ATP13A2 mit Sequenzen, die das Protein in der Plasmamembran verankern, könnte eine Lösung dieses Problems darstellen.

5.1.2 ATP13A2 und seine Rolle in der lysosomalen Funktion

ATP13A2 ist ein lysosomales Membranprotein. Dies konnten wir eindeutig zeigen. ATP13A2 trägt durch seine ATPase Funktion also wahrscheinlich zur Funktionsfähigkeit des Lysosoms bei. Seine genaue Rolle bzw. das transportierte Substrat sind bis heute allerdings unbekannt.

In den Lysosomen wird eine Vielzahl von Substraten mit Hilfe unterschiedlichster Hydrolasen abgebaut und recycelt. Die Aufnahme der Substrate erfolgt auf unterschiedlichen Wegen. Neben der Aufnahme von extrazellulären Substraten über Endozytose, stellt v.a. auch der Abbau intrazellulären Materials über Autophagie eine wichtige Aufgabe dar (Abb. 3.2). V.a. die Makroautophagie spielt dabei eine wichtige Rolle, da auf diesem Wege ganze Zellorganellen abgebaut werden. Bekanntestes Beispiel hierfür ist die Mitophagie, der Abbau defekter Mitochondrien über Autophagie (Abb. 3.5) (Settembre et al. (2013); Xie and Klionsky (2007)).

Ein funktionstüchtiges Lysosom ist für viele Abbauprozesse essentiell und von vielen Faktoren abhängig. Ein saurer pH-Wert ist entscheidend, da alle enthaltenen Hydrolasen ein saures pH-Optimum aufweisen. Eine intakte lysosomale Membran schützt den Rest der Zelle vor dem Inhalt des Lysosoms. Werden Cathepsine (Endoproteasen) und andere Hydrolasen des Lysosoms ins

Zytoplasma freigesetzt, kann dies Apoptose auslösen (Aits and Jaattela (2013)). Auch der korrekte Transport der lysosomalen Hydrolasen und der lysosomalen Membranproteine ist für die Funktion unerlässlich (Saftig (2005)). Der Beitrag von ATP13A2 zur lysosomalen Funktion ist unbekannt. Da es sich um eine ATPase handelt, transportiert sie ein Substrat über die lysosomale Membran hinweg. Was dieses Substrat allerdings ist, ist unbekannt. Es liegt jedoch nahe, dass der Funktionsverlust von ATP13A2 durch Mutation zu einer funktionellen Beeinträchtigung des Lysosoms führen könnte.

Um diese Frage zu klären, haben wir in einem ersten Schritt allgemeine lysosomale Funktionen untersucht. Im ATP13A2 *Knockdown* ergaben sich bezüglich der lysosomalen Verteilung und Morphologie sowie der lysosomalen Masse keine Unterschiede (Abb. 4.11). Es wurde auch keine grundlegende, funktionelle Beeinträchtigung festgestellt. Die Maturierung von Cathepsin D war im *Knockdown* von ATP13A2 unbeeinflusst, das bedeutet, dass der pH-Wert der Lysosomen sehr wahrscheinlich nicht beeinträchtigt ist (Abb. 4.11). In einem zweiten Schritt wurde die lysosomale Funktion in Hinblick auf die Autophagie, genauer gesagt auf Mitophagie untersucht. Für den Abbau geschädigter Mitochondrien über Mitophagie ist ein funktionierendes Lysosom unverzichtbar. So konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Bafilomycin, die zu einem Anstieg des lysosomalen pHs durch Inhibierung der Protonenpumpe führt, Mitophagie inhibieren kann (Narendra et al. (2008)). Ebenso findet keine Mitophagie in Atg5 und Atg7 defizienten Zellen statt. Beide Proteine sind Schlüsselkomponenten des Autophagieprozesses (Narendra et al. (2008); Okatsu et al. (2010); Matsuda et al. (2010)). In unseren Experimenten zeigte ATP13A2 keinen Einfluss auf die Mitophagie (Abb. 4.13), was gegen eine Beeinträchtigung der lysosomalen Funktion durch einen *Knockdown* von ATP13A2 spricht. Die Überexpression von ATP13A2 zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf die Mitophagie (Abb. 4.12). Ähnliche Beobachtungen konnten auch andere Arbeitsgruppen feststellen. In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christian Kubisch wurde im Hefemodell ebenfalls kein Einfluss auf die Autophagie durch einen Verlust des ATP13A2 Hefe-Analogons *Ypk9* beobachtet (Stiller (2009)). Dennoch finden sich in der Literatur auch andere Ergebnisse. Vor allem in Patientenfibroblasten war die lysosomale Funktion teils massiv beeinträchtigt. Am deutlichsten konnte dies die Arbeitsgruppe von Erwan Bezward zeigen. Sie verwendeten Fibroblasten zweier Patienten, einmal mit den *compound*-heterozygoten Mutationen delC und S13 und zum Zweiten mit der homozygoten Mutation 1550C>T. In den Patientenfibroblasten akkumulierten Lysosomen sehr stark und ihre Funktionalität war stark eingeschränkt. Der pH-Wert ist bis fast ins Neutrale erhöht, wodurch die Cathepsin Maturierung und Funktionalität, genauso wie die lysosomale Proteolyse, stark eingeschränkt war. Die Makroautophagie war beeinträchtigt und Substrate der Chaperon-medierten Autophagie akkumulierten. Diese Effekte konnten in stabilen *Knockdown*-Zellen rekapituliert werden. Außerdem führte eine erneute Hinzutransfektion des ATP13A2 Wildtyps zu einer Revertierung der Effekte in stabilen *Knockdown* Zellen (Dehay et al. (2012)). Ähnliche Effekte konnte die Gruppe von Dimitri Krainc zeigen. In Patientenfibroblasten und in stabil mit ATP13A2 shRNA transduzierten Neuronen stellten sie ebenfalls eine starke Akkumulation und Vergrößerung von Lysosomen fest. Lysosomale Substrate wurden deutlich

schlechter abgebaut, genauso wie Autophagosomen, die deswegen akkumulierten (Usenovic et al. (2012b)). Ein solch klarer Phänotyp wurde jedoch bei weitem nicht immer sichtbar. So konnte in anderen Analysen festgestellt werden, dass ein ATP13A2 *Knockdown* zwar die Induktion der Autophagie inhibierte, ansonsten aber konnten keine weiteren lysosomalen Beeinträchtigungen beobachtet werden (Gusdon et al. (2012)). Matsui *et al.* detektierten insgesamt reduzierte Cathepsin D Mengen nach einem ATP13A2 *Knockdown*, ebenso wie eine leichte Inhibierung des Autophagosom-Abbaus, ansonsten aber keine massiven Veränderungen (Matsui et al. (2013)).

Für eine Beeinträchtigung der Lysosomen durch den Verlust von ATP13A2 sprechen Erkenntnisse, die man bei der Betrachtung einer ganz anderen Krankheit gewinnen konnte. In Patienten, die von neuronaler Ceroid-Lipofuszinose (NCL) betroffen sind, konnte eine homozygote *ATP13A2* Mutation gefunden werden. NCL bezeichnet eine heterogene Gruppe neurodegenerativer, lysosomaler Speicherkrankheiten, die sich durch den mangelnden Abbau und die Ablagerung eines Fett-Protein-Gemisches in der Zelle auszeichnet, hervorgerufen durch defekte Lysosomen (Mole and Williams (2013)). Die betroffenen Patienten entstammen einer großen NCL-Familie aus Belgien und zeigten neben der NCL-Pathologie auch Parkinsonismus (Bras et al. (2012)). Die Identifizierung einer *ATP13A2* Mutation in einer lysosomalen Speicherkrankheit spricht für eine Beteiligung von ATP13A2 an der lysosomalen Funktion.

Grund für die unterschiedlichen Beobachtungen bezüglich der lysosomalen Funktion könnten die unterschiedlichen verwendeten Zellsysteme sein. Die massiven Effekte auf die lysosomale Funktion wurden in Patientenfibroblasten festgestellt, die keinerlei funktionsfähiges Protein mehr aufwiesen. In Zellkulturmodellen fallen die Effekte deutlich milder aus. Durch den siRNA oder shRNA vermittelten *Knockdown* bleibt immer ein Anteil funktionsfähigen Proteins vorhanden, der eventuell ausreicht, um die Funktionalität des Systems aufrecht zu erhalten. Insgesamt kann eine Schädigung des Lysosoms durch den Verlust von ATP13A2 nicht ausgeschlossen werden. Der Test in einem anderen Zellsystem, am besten in Zellen mit möglichst geringen Mengen funktionalen ATP13A2 und die Überprüfung weiterer lysosomaler Funktionen, z.B. eine genauere Überprüfung der lysosomalen Distribution und Maturierung oder des lysosomalen pH-Werts über pH-sensitive *LysoTracker* könnte darüber Aufschluss geben. Die Analyse von Zellen einer *ATP13A2-Knockout* oder *Knock-in* Maus könnte dafür beispielsweise eine gute Grundlage darstellen.

Die funktionelle Beeinträchtigung der Lysosomen könnte in der Zelle eine Vielzahl von Auswirkungen haben. In erster Linie wäre der Abbau von lysosomalen Substraten beeinträchtigt. Dadurch könnte es zu einer Akkumulation von lysosomalen Substraten und einer Aggregatbildung von nicht abgebauten Proteinen kommen. Dass eine Akkumulation von lysosomalen Substraten tatsächlich Ursache von Krankheiten sein kann, zeigen die lysosomalen Speicherkrankheiten (Futerman and van Meer (2004)). Eine Aggregatbildung ist auch in zahlreichen, neurodegenerativen Krankheiten zu beobachten, v.a. bei Morbus Parkinson. Die Ablagerung von α -Synuklein in *Lewy* Körperchen stellt bis heute eines der wichtigsten Erkennungszeichen von Morbus Parkinson dar. Usenovic *et al.* konnten eine Akkumulation von α -Synuklein nach einem Verlust von ATP13A2

nachweisen (Usenovic et al. (2012b); Usenovic et al. (2012a)). Auch andere mit Parkinsonismus assoziierte Proteine neigen zur Aggregatbildung. Mutationen in Parkin führen zur Bildung von Aggregaten im Zytoplasma der Zelle (Henn et al. (2005)). Dadurch kann Parkin seine physiologische Funktion nicht mehr ausführen (Pils (2012)). In der Folge des gestörten Abbaus von lysosomalen Substraten könnte es zu einem Absterben von Zellen kommen. Eine weitere mögliche Folge eines Funktionsverlusts von ATP13A2 und einem dadurch geschädigten Lysosom könnte der verzögerte Abbau ganzer Zellorganellen sein. Die Akkumulation von geschädigten Mitochondrien beispielsweise, die durch den Funktionsverlust der Lysosomen nicht über Mitophagie abgebaut würden, könnten zu einer Schädigung der mitochondrialen Funktion führen. Die Energieversorgung der Zelle wäre somit nicht mehr gewährleistet, was letztendlich zu einem Absterben der Zelle führen könnte. Eine weitere Gefahr stellt die Schädigung der Struktur der Lysosomen dar, was zu einer Ruptur der Lysosomen führen könnte. Der Kontakt des sauren lysosomalen Inhalts und der lysosomalen Enzyme mit dem Zytoplasma hätte ein Absterben der Zelle zur Folge (Dehay et al. (2010)). Welche Auswirkungen genau ATP13A2 auf die lysosomale Struktur und Funktion aufweist und welche Konsequenzen sich daraus ergeben, ist bislang aber noch nicht abschließend geklärt und bedarf noch weiteren, intensiven Untersuchungen.

ATP13A2 rückt die Bedeutung funktionseingeschränkter Lysosomen als Ursache für Parkinsonismus stärker in das Licht der Forschung. Funktionelle Lysosomen sind für eine gesunde Zelle unerlässlich. Kommt es zu einem Funktionsverlust, kann dies zu Zellschädigungen bis hin zur Apoptose führen, was in zahlreiche unterschiedliche Krankheiten mündet. Einen direkten Zusammenhang zwischen geschädigtem Lysosom und einer Krankheit findet sich in der Gruppe der lysosomalen Speicherkrankheiten (Futerman and van Meer (2004)). Darüber hinaus konnte eine Verbindung der Lysosomen zu neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Chorea Huntington hergestellt werden (Zhang et al. (2009)). Auch in Bezug auf Parkinsonismus mehren sich die Hinweise auf eine Beteiligung der Lysosomen an seiner Pathologie. In Hirn-Proben von Patienten konnte eine Abnahme von lysosomalen Markern festgestellt werden (Chu et al. (2009)). Darüber hinaus wurden Mutationen im Gen *β -Glucocerebrosidase* (GBA) als ein Risikofaktor für die Entwicklung von Parkinsonismus identifiziert (Sidransky et al. (2009)). GBA ist ein lysosomales Enzym, das für die Spaltung von Glycosylceramid in Glucose und Ceramid verantwortlich ist. Mutationen in *GBA* führen zu einer Akkumulation des Substrats und so zur häufigsten lysosomalen Speicherkrankheit Morbus Gaucher. Morbus Gaucher Patienten zeigen oft zusätzlich eine dem Parkinsonismus ähnliche Symptomatik (Futerman and van Meer (2004)). Nicht zuletzt die Entdeckung des lysosomalen Membranproteins ATP13A2 als monogenetische Ursache für Parkinsonismus spricht für eine Beteiligung der Lysosomen an der Pathologie von Parkinsonismus.

5.1.3 ATP13A2 und seine Verbindung zu den Mitochondrien

Während der Untersuchungen zur Mitophagie konnten Veränderungen der Mitochondrien im ATP13A2 *Knockdown* beobachtet werden, die im Folgenden genauer untersucht wurden. Dabei

zeigte sich, dass die mitochondriale Morphologie durch einen Verlust von ATP13A2 deutlich beeinflusst war. Statt als intaktes Netzwerk in der gesamten Zelle (Westermann (2010)) lagen die Mitochondrien um den Kern kondensiert vor. Die mitochondriale Masse war nicht verändert, was sich mit der Beobachtung, dass Mitophagie durch einen *Knockdown* von ATP13A2 nicht verändert war, deckt (Abb. 4.14). Die Funktionalität der Mitochondrien war eingeschränkt, was sich in einer leicht reduzierten ATP-Produktion äußerte (Abb. 4.15).

Andere Arbeitsgruppen konnten ähnliche Beobachtungen bzgl. einer Veränderung der mitochondrialen Morphologie und Funktion machen. Gusdon *et al.* beobachteten nach *Knockdown* von ATP13A2 ebenfalls Veränderungen der mitochondrialen Morphologie. Sie detektierten Mitochondrien, die stärker fragmentiert waren und eine höhere Produktion reaktiver Sauerstoff-Spezies aufwiesen (Gusdon et al. (2012)). Mitochondriale Fragmentierung im ATP13A2 *Knockdown* beobachteten auch von Ramonet *et al.* (Ramonet et al. (2012)). Die Daten aus kultivierten Zellen wurden durch Analysen in KRS-Patientenzellen unterstützt. Die Mitochondrien der Patientenfibroblasten erschienen deutlich fragmentiert und in ihrer ATP-Produktion eingeschränkt (Grünwald et al. (2012)). Allerdings führten sowohl Gusdon *et. al* als auch Grünwald *et.al* den mitochondrialen Phänotyp auf eine Akkumulation geschädigter Mitochondrien durch verringerten Abbau über Mitophagie zurück, schloßen also auf einen Verlust der lysosomalen Funktion durch den Funktionsverlust von ATP13A2.

Die von uns generierten Daten lassen einen anderen Schluss zu. Wir stellten zwar keinen Einfluss eines ATP13A2 *Knockdowns* auf Lysosomen fest, sehr wohl aber auf Mitochondrien. ATP13A2 scheint einen Einfluss auf die Mitochondrien über ihren Abbau hinaus zu besitzen. Eine mögliche Erklärung wäre der von uns beobachtete Zusammenhang zwischen ATP13A2 und der AMP-aktivierten Proteinkinase (PRKA). Wir konnten zeigen, dass ein *Knockdown* von ATP13A2 zu reduzierten Mengen verschiedener PRKA-Untereinheiten führte. Dieser Zusammenhang besteht bereits auf Ebene der Transkription, da reduzierte mRNA Mengen detektiert wurden. Daraus lassen sich gut die beobachteten reduzierten Proteinmengen erklären (Abb. 4.17).

Die PRKA stellt den “Energiesensor“ der Zelle dar (Carling et al. (2011)) und induziert bei einer Verschiebung des ATP/AMP Verhältnisses in der Zelle katabole Signalweg. Dadurch werden Zellwachstum, die Differenzierung und der Metabolismus der Zelle beeinflusst (Mihaylova and Shaw (2011)). PRKA hat dabei auch eindeutige Auswirkung auf die mitochondriale Biogenese über eine direkte Verbindung zu *Peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 α* (PGC-1 α) und *nuclear respiratory factor 1* (NRF1). Erste Hinweise dazu lieferten Untersuchungen an jungen Ratten. Die chronische Aktivierung der PRKA in Muskeln führte hierbei zu einer Induktion der Transkription von Kern-kodierten mitochondrialen Genen (Winder et al. (2000)). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass Zellen, deren PRKA-Mengen durch Behandlung mit einem Kreatin-Analogon künstlich aktiviert wurden, eine erhöhte Bindeaktivität des Transkriptionsfaktors NRF1 und dadurch eine induzierte mitochondriale Biogenese aufwiesen (Bergeron et al. (2001)). Durch weitere Untersuchungen konnte dieser Mechanismus genauer aufgeschlüsselt wer-

den. Nach Energieverlust reguliert PRKA in der Zelle PGC-1 α , welches wiederum mitochondriale Biogenese induziert. Wird die PRKA durch eine dominant-negative Mutante inhibiert, wird auch keine mitochondriale Biogenese ausgelöst (Zong et al. (2002)). Die Aktivierung von PGC-1 α erfolgt dabei durch Phosphorylierung durch die PRKA (Jäger et al. (2007)). Eine Reduktion der PRKA Mengen könnte also durch eine verringerte Aktivierung von PGC-1 α und NRF1 Auswirkungen auf die Mitochondrien haben und so die Veränderungen der mitochondrialen Struktur erklären. Dieser Zusammenhang liefert neben einem gestörten lysosomalen Abbau eine Erklärung für die mitochondrialen Veränderungen durch einen ATP13A2 *Knockdown*, der unabhängig von der lysosomalen Funktion ist. Damit erweitert sich das mögliche funktionale Spektrum von ATP13A2 über eine rein lysosomale Funktion hinaus.

5.1.4 NRF1 reguliert die Transkription von *ATP13A2*

Um weiteren Einblick in die Funktionalität von ATP13A2 zu erhalten, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch seine Regulation untersucht. Für andere autosomal rezessiv vererbte, mit Parkinsonismus assoziierte Gene konnte eine Induktion der Transkription durch unterschiedlichen zellulären Stress beobachtet werden (Bouman (2010)). *Parkin* beispielsweise wird sowohl durch ER-assoziierten Stress als auch durch mitochondrialen Stress langanhaltend induziert (Bouman et al. (2010)). Durch die Analyse der regulierenden Transkriptionsfaktoren konnte auf ein zellprotektives Verhalten von Parkin geschlossen werden. Ähnliches wurde auch für *ATP13A2* angewendet und seine Regulation untersucht und analysiert.

Zuerst sollte geklärt werden, ob es sich bei *ATP13A2* um ein Stress-induzierbares Gen handelt. Tatsächlich konnten wir eindeutig belegen, dass *ATP13A2* durch verschiedenste zelluläre Stressoren deutlich und langanhaltend induziert wurde. Reagenzien, die ER-assoziierten oder mitochondrialen Stress auslösen, ebenso wie Inhibitoren des Proteasoms oder des Lysosoms, die die zelluläre Proteostase stören, und ein Hungern der Zellen durch Entzug von Nährstoffen führte zu einer zeit- und dosis-abhängigen Induktion von *ATP13A2* mRNA (Abb. 4.18). Diese Stressantwort der Zelle war in murinen, primären Zellen konserviert (Abb. 4.19). Interessanterweise führte die Behandlung von Zellen mit Mn²⁺ zu keiner Induktion von *ATP13A2* (Abb. 4.18). Mangan wurde als mögliches Substrat von ATP13A2 beschrieben. Durch eine Hochregulation von ATP13A2 könnte die Zelle versuchen, die Mangan-Homöostase wieder korrekt zu regulieren. Unsere Beobachtungen sprechen also eher gegen Mangan als das von ATP13A2 transportierte Substrat.

Die Hochregulation von *ATP13A2* stellt eine Antwort der Zelle auf Stress dar, die durch eine Vielzahl von Stressoren ausgelöst werden kann. Sie scheint eine allgemeine Reaktion auf einen verschlechterten Status der Zelle darzustellen und nicht gezielt durch nur einen Signalweg ausgelöst zu werden. Eine solche Hochregulation von *ATP13A2* wurde auch als physiologische Reaktion der Zelle auf Schäden identifiziert. Die Analyse der ATP13A2 Mengen in dopaminergen Neuronen von Morbus Parkinson-Patienten ergab erhöhte ATP13A2 Mengen im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Ramirez et al. (2006)).

Als Ziel der Hochregulation von ATP13A2 identifizierten wir den Schutz der Zelle vor Stress-induziertem Zelltod. Eine Überexpression von ATP13A2 schützte die Zelle vor Apoptose, ausgelöst durch einen allgemeinen, sehr potenten Kinase-Inhibitor (Abb. 4.32). Im Gegensatz dazu machte ein Verlust von ATP13A2 Zellen anfälliger für Stress-induzierte Apoptose (Abb. 4.31). Aus diesen Ergebnissen lässt sich eindeutig ableiten, dass ATP13A2 zellprotektive Eigenschaften besitzt. Ähnliches konnten auch andere Arbeitsgruppen beobachten. ATP13A2 zeigte zellprotektive Eigenschaften v.a. gegenüber einigen dikovalenten Kationen (Tan et al. (2011); Covy et al. (2012); Park et al. (2014)), aber auch gegenüber anderen zellulären Stressoren wie oxidativen, mitochondrialen oder ER-assoziierten Stress (Ugolino et al. (2011); Covy et al. (2012)). Eine erhöhte Anfälligkeit von Zellen ohne funktionsfähiges ATP13A2 konnte für Patientenzellen gezeigt werden. Die Apoptose-Rate in gestressten Lymphozyten von KRS-Patienten war im Vergleich zu gesunden Kontrollen deutlich erhöht (Radi et al. (2012)).

Über welchen zellulären Signalweg die Protektivität von ATP13A2 vermittelt wird, konnte in dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden. Die bisherigen Analysen legen v.a. eine Fehlfunktion von Lysosomen oder Mitochondrien als möglichen Auslöser von Apoptose nahe. Unsere Untersuchungen der Regulation von *ATP13A2* lieferte einen neuen Hinweis auf einen möglicherweise beteiligten Signalweg.

Um die Regulation von *ATP13A2* weiter aufzuschlüsseln, analysierten wir über eine bioinformatische Analyse des Promotors von *ATP13A2* die für die Regulation von *ATP13A2* wichtigen Transkriptionsfaktoren. Dabei identifizierten wir v.a. NRF1 als möglichen, wichtigen Transkriptionsfaktor von *ATP13A2*. Bindestellen für NRF1 lagen in mehreren Säugetierarten konserviert, rund um die Transkriptions-Start-Stelle verteilt, vor (Abb. 4.20). Das spricht für eine hohe Relevanz dieses Transkriptionsfaktors für die Regulation von *ATP13A2*. Dementsprechend bestätigte sich NRF1 im Luziferase-Reporter-*Assay* als Transkriptionsfaktor von *ATP13A2* (Abb. 4.23). Darüber hinaus war NRF1 dazu in der Lage durch Überexpression endogenes *ATP13A2* zu induzieren (Abb. 4.24) und wurde selbst durch zellulären Stress in sehr ähnlichem Maße wie *ATP13A2* reguliert (Abb. 4.25). Unterstützend zeigten wir, dass auch der Koaktivator von NRF1, PGC-1 α , die Transkription von *ATP13A2* reguliert. PGC-1 α aktivierte die Transkription des ATP13A2-Reporter-Konstrukts im Luziferase-Reporter-*Assay* (Abb. 4.23) ebenso, wie die Transkription von endogenem *ATP13A2* nach Überexpression von PGC-1 α in Zellen induziert wurde (Abb. 4.26). Fehlte PGC-1 α durch *Knockdown* in Zellen, führte dies zu einer Beeinträchtigung der PGC-1 α induzierten *NRF1*-Transkription und auch zu erniedrigten Mengen von *ATP13A2* (Abb. 4.28/4.29). Insgesamt lassen diese Ergebnisse eindeutig auf eine Regulation von *ATP13A2* durch den PGC-1 α /NRF1-Signalweg schließen.

Die Arbeitsgruppe von Weihong Song konnten noch einen weiteren *ATP13A2* regulierenden Transkriptionsfaktor identifizieren. HIF-1 α bindet an *Hypoxia response elements* (HRE) im Promotor von *ATP13A2*. Xu *et. al* konnten HIF-1 α als Transkriptionsfaktor von *ATP13A2* bestätigen und stellten fest, dass die Expression von *ATP13A2* durch Hypoxie induziert wurde. In unserer

bioinformatischen Analyse des *ATP13A2* Promotors konnten wir keine HRE im Promotor von *ATP13A2* feststellen.

Dennoch sind Verbindung zwischen den beiden Wegen denkbar. Zwischen mitochondrialer Biogenese induziert durch PGC-1 α und NRF1 und Hypoxie besteht ein Zusammenhang. In Mäusen, die einer hypoxischen Schädigung ausgesetzt waren, konnte eine Hochregulation von PGC-1 α und NRF1 sowie vermehrte mitochondriale Biogenese festgestellt werden (Yin et al. (2008), Gutsaeva et al. (2008)). Desweiteren wurde ein Zusammenhang zwischen PGC-1 α und dem HIF-1 α Signalweg identifiziert, der in den Zellen einen erhöhten Sauerstoffverbrauch durch mitochondriale Biogenese mit einer erhöhten Bereitstellung von Sauerstoff koppelt (O'Hagan et al. (2009)). Die Identifizierung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren könnte also trotzdem auf eine Beteiligung an einem gemeinsamen Signalweg sprechen, nämlich eine Verbindung zur bioenergetischen Regulation in der Zelle.

Über den PGC-1 α /NRF1-Signalweg wird hauptsächlich mitochondriale Biogenese induziert. NRF1 ist ein Transkriptionsfaktor für im Zellkern kodierte Gene, die unterschiedliche mitochondriale Funktionen steuern, z.B. Komponenten der Atmungskette (Dhar et al. (2008)), Faktoren der mitochondrialen Transkription (Virbasius and Scarpulla (1994)), der Häm-Biosynthese (Braidotti et al. (1993)) und der mitochondrialen Importmaschinerie (Takahashi et al. (2002); Blesa et al. (2008)). PGC-1 α ist Transkriptionsfaktor und gleichzeitig ein Koaktivator für NRF1. PGC-1 α stimuliert mitochondriale Biogenese über seine Wirkung auf NRF1 (Wu et al. (1999)). NRF1 beeinflusst so grundlegende Funktionen der Mitochondrien und mitochondriale Biogenese. Darüber hinaus konnten NRF1 aber auch weitere Eigenschaften zugesprochen werden. Es wurde als Transkriptionsfaktor für viele weitere Promotoren von ubiquitinär exprimierten Proteinen gefunden (FitzGerald et al. (2004)), so z.B. für die Familie der Transkriptionsfaktoren E2F, die das Zellwachstum und den Zellzyklus regulieren (Cam et al. (2004)). Somit kommt NRF1 regulatorische Wirkung auch jenseits einer direkten mitochondrialen Beteiligung zu. Die Annahme einer breiteren Beteiligung von NRF1 an biologischen Prozessen wird durch die frühe Letalität von *NRF1 Knockout* Mäusen bestätigt (Huo and Scarpulla (2001)). Die alleinige Schädigung von Mitochondrien, wie sie sich ähnlich in *Tfam Knockout* Mäusen zeigt (Larsson et al. (1998)), führt zu einer deutlich späteren Letalität als in den *NRF1 Knockout* Mäusen. Somit muss NRF1 weitergehende Eigenschaften besitzen, die zur Entwicklung des Organismus beitragen. Anzunehmen ist, dass v.a. Prozesse betroffen sind, die ihrerseits energieintensiv sind und so indirekt Einfluss auf die Mitochondrien als Produktionsort der Energie nehmen. Tatsächlich konnte ein solcher Zusammenhang durch die Regulation der Na⁺/K⁺-ATPase in den Neuronen hergestellt werden. Johar et al. konnten zeigen, dass NRF1 die Expression von Untereinheiten der Na⁺/K⁺-ATPase steuert und so eine Verbindung zwischen Energieverbrauch und Energieproduktion herstellt (Johar et al. (2012)). Ähnliches wäre auch für *ATP13A2* denkbar. Eine Regulation von *ATP13A2* durch NRF1 könnte den Energieverbrauch dieser ATPase kontrollieren und eine direkte Verbindung zur Energieproduktion herstellen. Gleichzeitig hat ATP13A2 einen Einfluss auf die Menge der PRKA, den "Energiesensor" der Zelle, der wiederum in engem Kontakt zu PGC-1 α und NRF1 steht. Es wäre

also möglich, dass alle vier Proteine in enger Kommunikation stehen, um den Energiehaushalt der Zelle über eine Beeinflussung der mitochondrialen Dynamik und Morphologie unter Kontrolle zu halten.

5.2 Die Parkinsonismus-assoziierten Gene lassen auf gemeinsame Pathomechanismen schließen

ATP13A2 ist das bislang jüngste, als monogenetische Ursache für Morbus Parkinson bestätigte Gen. Damit erweitert es die Liste der monogenetischen Ursachen für Morbus Parkinson auf sechs Gene (Tab. 3.5). Die Gene kodieren für unterschiedliche Proteine, die unterschiedliche Funktionen und Lokalisationen aufweisen. Dennoch zeigen sich deutliche Überlappungen bezüglich der Pathologien, die durch Mutationen in diesen Genen ausgelöst werden. Die deutlichsten Schnittmengen finden sich dabei bezüglich der Mitochondrien und des zellprotektiven Potentials der Proteine.

Während der Erforschung des Parkinsonismus geriet v.a. ein Zellorganell als mögliche Ursache für Parkinsonismus in den Fokus - das Mitochondrium. Sowohl Toxine, die Parkinsonismus auslösen (Markey et al. (1984); Exner et al. (2012)), als auch die mit Parkinsonismus assoziierten Gene weisen einen Einfluss auf die mitochondriale Morphologie und Funktion auf (Kamp et al. (2010); Wang et al. (2012); Exner et al. (2007); Lutz et al. (2009); Irrcher et al. (2010)). Die Toxine und Gene schädigen die Mitochondrien zwar jeweils sehr unterschiedlich und führen auch zu unterschiedlichen Veränderung, gemeinsam ist ihnen aber immer eine veränderte mitochondriale Morphologie und in ihrer Folge auch eine eingeschränkte Funktion. Einen solchen Einfluss weist auch *ATP13A2* auf. Ein Verlust von *ATP13A2* führt zu veränderten und funktionell eingeschränkten Mitochondrien. Mutationen in den Genen führen nicht nur zu ähnlichen Effekten, oft ist es sogar möglich, die beobachteten Effekte durch Überexpression der autosomal rezessiv vererbten Gene aufzuheben (Exner et al. (2012)).

So können die Gene *Parkin*, *PINK1* und *DJ-1* die durch α -Synuklein induzierte mitochondriale Fragmentierung wieder revertieren. Auch eine Überexpression von *ATP13A2* führt dazu, dass Mitochondrien trotz erhöhter α -Synuklein Mengen ein normales, tubuläres Mitochondriennetzwerk ausbilden. Diese Eigenschaft stellt also eine weitere Gemeinsamkeit mit den anderen rezessiv vererbten Parkinsonismus-Genen dar. Der Zusammenhang zwischen *ATP13A2* und α -Synuklein könnte über diese Eigenschaft aber noch hinausgehen. In verschiedenen Untersuchungen bewies *ATP13A2* Potential, die α -Synuklein induzierte Toxizität zu modulieren. In Hefe unterdrückte Ypk9, das Ortholog von *ATP13A2*, α -Synuklein induzierte Toxizität, ebenso wie Catp6, das *C. elegans* Ortholog, die α -Synuklein Toxizität in *C. elegans*. Dieser Effekt war auch in dopaminergen Neuronen konserviert (Gitler et al. (2009)). Usenovic *et. al* sehen eine lysosomale Dysfunktion durch den Verlust von *ATP13A2* als Ursache für die α -Synuklein Toxizität an. Das als CMA-Substrat beschriebene α -Synuklein (Cuervo et al. (2004)) wurde durch eine gestörte lysosomale Funktion nicht mehr richtig abgebaut und akkumulierte in den Zellen, was in der Folge zu Zell-

tot führte (Usenovic et al. (2012b)). Dementsprechend wäre eine verbesserte lysosomale Funktion durch erhöhte ATP13A2 Mengen schützend.

Ob erhöhte ATP13A2 Mengen die lysosomale Aktivität tatsächlich steigern, ist bisher nicht bekannt. Wohl aber konnten wir zeigen, dass zelluläre Stresssituationen ATP13A2 transkriptionell hochregulierten und erhöhte ATP13A2 Mengen tatsächlich auch protektiv für die Zelle waren. Auch darin findet sich eine Eigenschaft, die v.a. die autosomal rezessiv vererbten Parkinsonismus assoziierten Gene gemeinsam haben. Die Expression von *Parkin*, *PINK1* und *DJ1* wird durch zellulären Stress induziert (Bouman (2010)). Gleichzeitig weisen die Gene protektives Potential auf (Müller-Rischart et al. (2013); Petit (2005); Taira et al. (2004)). Ähnlich wie bei den Mitochondrien, sind die Signalwege, über die die Gene ihr protektives Potential ausüben, unterschiedlich. Dennoch führen alle zu einem Schutz der Zelle vor Stress-induziertem Zelltod. Gemeinsam ist ihnen auch, dass die Zellen bei einem Verlust der Proteine deutlich anfälliger für Stress-induzierten Zelltod werden.

Durch die gemeinsamen Eigenschaften der mit Parkinsonismus assoziierten Gene bezüglich der beobachteten Pathologien lassen sich zwei Ansatzpunkte als mögliche Ursachen von Parkinsonismus ausmachen - Veränderungen in der mitochondrialen Struktur und Funktion und der Verlust des protektiven Potentials der Proteine. ATP13A2 fügt sich in dieses Bild ein. Auch dieses rezessiv vererbte Gen besitzt Einfluss auf die mitochondriale Morphologie und zellprotektives Potential. Darüber hinaus fügt ATP13A2 dem "Puzzle" Parkinsonismus aber noch zwei weitere Teile hinzu - den PGC-1 α /NRF1-Signalweg und die Lysosomen. Die Aufgabe künftiger Untersuchungen wird es sein, diese neuen Teile in das Bild einzufügen, um so ein tiefergreifendes Verständnis für die Krankheit zu entwickeln. Denn sobald die Mechanismen, die zu dieser Krankheit führen verstanden sind, besteht die Möglichkeit, ursächlich wirksame Medikamente zu entwickeln und der Heilung des Parkinsonismus näher zu kommen.

6 Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Zellkultur

6.1.1.1 Zellkulturstämme

Zelllinie	Herkunft	Medium	Referenz
SH-SY5Y	Humane Neuroblastoma-Zellen	DMEM-F12 + 10% FKS + 1% Pen/Strep	DSMZ-Nr. ACC 209
HEK-293T	Humane embryonale Nieren-Zellen	DMEM GlutaMax + 10% FKS + 1% Pen/Strep	ATCC-Nr. CRL-1573
HeLa	Humane immortalisierte Zervixkarzinom-Zellen	DMEM GlutaMax + 10% FKS + 1% Pen/Strep	DSMZ-Nr. ACC 57
MEF	Murine embryonale Fibroblasten	DMEM GlutaMax + 10% FKS + 1% Pen/Strep	Eigene Herstellung aus Wildtyp Bl6/C57J Mäusen
Helferzellen	HEK	DMEM GlutaMax + 15% FKS + 1% NEAA	Peer-Hendrik Kuhn
Primäre MEF	Murine embryonale Fibroblasten	DMEM GlutaMax + 15% FKS + 1% Pen/Strep	Eigene Herstellung aus Wildtyp Bl6/C57J Mäusen
Primäre kortikale Neuronen	Murine embryonale kortikale Neuronen	Neurobasal + L-Glutamin + B27 + 1% Pen/Strep	Eigene Herstellung aus Wildtyp Bl6/C57J Mäusen

6.1.1.2 Bakterien

Bakterienlinie	Herkunft	Medium	Referenz
DH5- α	E. coli	LD-Medium	Eigene Herstellung (Hanahan and Meselson (1983))

Stellar competent cells	E. coli	SOC-Medium	Clontech, Mountain View, CA, USA
-------------------------	---------	------------	-------------------------------------

6.1.1.3 Medien

Name	Hersteller
B27	GIBCO (Invitrogen) (Karlsruhe, Deutschland)
DMEM F12	GIBCO (Invitrogen) (Karlsruhe, Deutschland)
DMEM GlutaMax	GIBCO (Invitrogen) (Karlsruhe, Deutschland)
DMEM no Glucose	GIBCO (Invitrogen) (Karlsruhe, Deutschland)
fetales Kälberserum (FKS)	GIBCO (Invitrogen) (Karlsruhe, Deutschland)
HBSS	GIBCO (Invitrogen) (Karlsruhe, Deutschland)
LB Agar	Pro 1 L: 10 g Bacto Tryptone + 5 g Yeast Extract + 5 g NaCl + 15 g Bacto Agar
LB-Medium	Pro 1 L: 10 g Bacto Tryptone + 5 g Yeast Extract + 5 g NaCl
L-Glutamat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Neurobasal	GIBCO (Invitrogen) (Karlsruhe, Deutschland)
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	GIBCO (Invitrogen) (Karlsruhe, Deutschland)
OptiMEM	GIBCO (Invitrogen) (Karlsruhe, Deutschland)
SOC Medium	Clontech, Mountain View, CA, USA

6.1.1.4 Reagenzien

Name	Hersteller
Lipofectamine	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Lipofectamine 2000	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Lipofectamine RNAiMax	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Plus Reagenz	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Trypsin-EDTA (0,5 g/L Trypsin, 0,2 g/L EDTA)	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)

6.1.1.5 Antibiotika

Name	Hersteller
Ampicillin	Boehringer (Mannheim, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin (100x, 5000 U/mL Penicillin G, 5 mg/mL)	GIBCO (Invitrogen) (Karlsruhe, Deutschland)

6.1.1.6 Zubehör

Name	Hersteller
Zellkulturflaschen	Nuncbrand (Roskilde, Dänemark)
Zellkulturplatten	Nuncbrand (Roskilde, Dänemark)

6.1.2 Konstrukte und Oligonukleotide**6.1.2.1 Plasmide****6.1.2.1.1 Leervektoren**

Plasmid	Herkunft
pcDNA 3.1 (+)	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
pcDNA 6 V5/His (A)	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
pGL4.23 Luc	Promega (Madison, WI, USA)
pKLO I	Moffat et al. (2006)

6.1.2.1.2 DNA-Konstrukte

Plasmid	Vektor	Restriktions- enzym	Tag	Herkunft
Wildtyp ATP13A2	pcDNA3.1 V5/His TOPO	/	V5/His C-terminal	Christian Kubisch; Ramirez et al. (2006)

ATP13A2 del C	pcDNA3.1 V5/His TOPO	/	V5/His C-terminal	Christian Kubisch; Ramirez et al. (2006)
ATP13A2 i16	pcDNA3.1 V5/His TOPO	/	V5/His N-terminal	Christian Kubisch; Ramirez et al. (2006)
ATP13A2 S13	pcDNA3.1 V5/His TOPO	/	V5/His N-terminal	Christian Kubisch; Ramirez et al. (2006)
Wildtyp ATP13A2	pcDNA6 V5/His	EcoR I	V5/His C-terminal	Carolin Schweimer
ATP13A2 Del 1A	pcDNA6 V5/His	EcoR I	V5/His C-terminal	Carolin Schweimer
ATP13A2 Del 11	pcDNA6 V5/His	EcoR I	V5/His C-terminal	Carolin Schweimer
ATP13A2 Del 12	pcDNA6 V5/His	EcoR I	V5/His C-terminal	Carolin Schweimer
ATP13A2 Del 2A	pcDNA6 V5/His	EcoR I	V5/His C-terminal	Carolin Schweimer
ATP13A2 Del 21	pcDNA6 V5/His	EcoR I	V5/His C-terminal	Carolin Schweimer
ATP13A2 Del 22	pcDNA6 V5/His	EcoR I	V5/His C-terminal	Carolin Schweimer
ATP13A2 Del 3A	pcDNA6 V5/His	EcoR I	V5/His C-terminal	Carolin Schweimer
ATP13A2 Del 31	pcDNA6 V5/His	EcoR I	V5/His C-terminal	Carolin Schweimer
ATP13A2 Del 32	pcDNA6 V5/His	EcoR I	V5/His C-terminal	Carolin Schweimer
ATP13A2 Promotor Reporter Konstrukt 1	pGL4.23 Luc	Kpn I/Hind III	/	Carolin Schweimer / Vanessa Welk

ATP13A2 Promotor Reporter Konstrukt 2	pGL4.23 Luc	Kpn I/Hind III	/	Carolin Schweimer / Vanessa Welk
ATP13A2 Promotor Reporter Konstrukt 3	pGL4.23 Luc	Kpn I/Hind III	/	Carolin Schweimer / Vanessa Welk
α -Synuklein wt	pCEP4	/	/	Nicole Exner
α -Synuklein A53T	pCEP4	/	/	Nicole Exner
Wildtyp NRF1	pcDNA 3.1 (+)	Xho I	/	Carolin Schweimer
Wildtyp NRF1	pcDNA 6 V5/His	Xho I	V5/His N-terminal	Carolin Schweimer
NRF1 DN 1-304	pcDNA 6 V5/His	Xho I	V5/His N-terminal	Carolin Schweimer / Vanessa Welk
EYFP	pcDNA 3.1 (+)	/	/	Clontech (Mountain View, CA, USA)
mCherry	pcS2 (+)	/	/	/
psPAX	/	/	/	Addgene 12260
VSV-G	pcDNA 3.1			

6.1.3 Primer und Oligonukleotide

6.1.3.1 Klonierungsprimer und Oligonukleotide

Name	Sequenz 5'- 3'
ATP13A2 wt pc6 forward 1	CAGTGTGGTGGGAATTTCCACCATGAGCGCAGACAGCA GCCCTCTCG
ATP13A2 wt pc6 forward 2	CAGCATTTGGGACCCAGGTCTTGGCAG
ATP13A2 wt pc6 reverse 1	CTGCCAAGACCTGGGTCCCAAATGCTG

ATP13A2 wt pc6 reverse 2	GATATCTGCAGAATTCCAACCTCAGGGGGCCGGCGGGC
ATP13A2 forward A	TGGAATTCTGCAGATATCCCCTCAGCTCCTCAGTTTCATC
ATP13A2 reverse A	GCCACTGTGCTGGATCAGAATTCAACCTCAGGGGGCCGGC
ATP13A2 LSS Oligoribonukleo- tid	CCCACCATGAGCGCAGACAGCAGCCCTCTCGTGGGCAGCAC GCCCACCGGTGCTGGGACCGCGACGATAGGGACATCAA- TAG
ATP13A2 Del forward 1	CAGTGTGGTGGAATTCCCACCATGCCACCGGTTATGGG ACCCTGAC
ATP13A2 Del forward 2	CAGTGTGGTGGAATTCCCACCATGATAGATCCCCTCAGC TCCTCAGTTTC
ATP13A2 Del forward 3	CAGTGTGGTGGAATTCCCACCATGCTCAGCGGCTACTGT GGCAGTCC
ATP13A2 Del reverse 1	GATATCTGCAGAATTCTGAAGCGCTTCTTGGAGGCCCGC
ATP13A2 Del reverse 2	GATATCTGCAGAATTCTTGGTCTAGCACGCTCTCCAGCATG
ATP13A2 Promotor Reporter Konstrukt forward 1	GAGGTACCAAGCATTTTCTTGTGTGATCCTCGCAGCAG
ATP13A2 Promotor Reporter Konstrukt forward 2	GAGGTACCTATCCTACAGGTTGGGAAAAGAGGGCCAG
ATP13A2 Promotor Reporter Konstrukt forward 3	GAGGTACCTGGAAGACATGGAGAGCTGGACCA

ATP13A2	CTTAAGCTTACTCCGCACTCACCTGCGCTCATGCC
Promotor	
Reporter	
Konstrukt reverse	
NRF1 wt forward	CACAGTGGCGGCCGCTCGAGCCCACCATGGAGGAAC
	ACGGAGTGACCCAAAC
NRF1 wt pc3.1	GCCCTCTAGACTCGAGTCACTGTTCCAATGTCACCA
reverse	CCTCCAC
NRF1 wt pc6	GCCCTCTAGACTCGAGTAACTGTTCCAATGTCACCA
reverse	CCTCCAC
NRF1 DN pc6	GCCCTCTAGACTCGAGCTGTGATGGTACAAGATGAG
reverse	CTATACTATG

6.1.3.2 RTPCR Primer

Name	Sequenz 5'- 3'
Human β -Actin forward	CCTGGCACCCAGCACAAT
Human β -Actin reverse	GGGCCGGACTCGTCATAC
Mouse β -Actin forward	AGCCTTCCTTCTTGGGTATG
Mouse β -Actin reverse	GGTCTTTACGGATGTCAACG
Human ATP13A2 forward	CCTCATTTCTCCATCTCCA
Human ATP13A2 reverse	AGTCCACCCACTCTTCCTCTC
Mouse ATP13A2 forward	TGACTCGGACAGGGTTCTG
Mouse ATP13A2 reverse	CGCAGCCACAACTTCAT
Human NRF1 forward	CTTATCCAGGTTGGTACGGGGGCA
Human NRF1 reverse	GGTGGCCTCTGATGCTTGCGT
Mouse NRF1 forward	CGAAAGAGACAGCAGACACG
Mouse NRF1 reverse	AAGACAGGGTTGGGTTTGG
Mouse PGC-1 α forward	ACAATGAGCCTGCGAACA
Mouse PGC-1 α reverse	GAGGGCAATCCGTCTTCA
Mouse PGC-1 β forward	CAGTACAGCCCCGATGACTC
Mouse PGC-1 β reverse	ATCCAGGGTCTTCGTAAGCG
Human PRKAA1 forward	CTGTTCTGCTGCTGGCTTAC

Human PRKAA1 reverse	AGGCGAGGTGAAACTGAAGA
Human PRKAA2 forward	CGAGAAGCAGAAACACGAC
Human PRKAA2 reverse	CACATCAAGGCTCCGAAT
Human PRKAG1 forward G	CCTCTTGCAATGGAGACGGTCA
Human PRKAG1 reverse	ACACGCTATTGTTGGATTCTGGGGT

6.1.3.3 siRNAs

Name	Hersteller	Sequenz
Stealth RNAi siRNA Negative Control High GC	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)	
Stealth RNAi siRNA Negative Control Medium GC	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)	
Stealth Select RNAi siRNA ATP13A2 HSS118713 (= siRNA 2)	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)	CCAACGUGAUCAGCAUACCGGUCAA
Stealth Select RNAi siRNA ATP13A2 HSS177397 (= siRNA 3)	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)	CAGAGCUGGUGUGCGAGCUACAGAA
Stealth Select RNAi siRNA PGC-1 α (= siRNA 2)	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)	GGUGAAAUUGAGGAAUGCACCGUAA
Stealth Select RNAi siRNA PGC-1 β (= siRNA 1)	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)	UGACGUGGACGAGCUUUCACUGCUA

6.1.3.4 shRNAs

Name	Hersteller	Sequenz
shRNA Kontrolle	Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA)	

ATP13A2 shRNA 3	Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA)	Forward Oligoribonukleotid: CGCGTCCGGCAT-CAACTTCAAGTTCTATAACTCGAGTTA-TAGAACTTGAAGTTGATGTTTTTGGAAA Reverse Oligoribonukleotid: CCGGTTTC-CAAAAACATCAACTTCAAGTTCTATAACTC-GAGTTATAGAACTTGAAGTTGATGCCGGA
ATP13A2 shRNA 5	Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA)	Forward Oligoribonukleotid: CGCGTCCGG-GCTGTCAGTGTAGCAAATAAACTCGAGTT-TATTTGCTACACTGACAGCTTTTTTGGAAA Reverse Oligoribonukleotid: CCGGTTTC-CAAAAAGCTGTCAGTGTAGCAAATAAACT-CGAGTTTATTTGCTACACTGACAGCCCGGA

6.1.4 Enzyme und Proteine

Name	Hersteller
Bovines Serum Albumin (BSA)	USB (Cleveland, OH, USA)
EcoR I HF	New England Biolabs (Schwalbach, Deutschland)
Hind III HF	New England Biolabs (Schwalbach, Deutschland)
Kpn I HF	New England Biolabs (Schwalbach, Deutschland)
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs (Schwalbach, Deutschland)
Shrimp-Alkaline Phosphatase	Roche (Mannheim, Deutschland)
T4 DNA Ligase	Roche (Mannheim, Deutschland)
Xho I	New England Biolabs (Schwalbach, Deutschland)

6.1.5 Antikörper

6.1.5.1 Primäre Antikörper

Bezeichnung	Spezies	WB	IF	Hersteller
Aktive Caspase-3	Kaninchen, polyklonal	1:1000	1:500	Cell Signaling (Boston, MA, USA)
AMPK- α	Kaninchen, polyklonal	1:1000		Cell Signaling (Boston, MA, USA)

Phospho-AMPK- α (Thr172)	Kaninchen, polyklonal	1:1000		Cell Signaling (Boston, MA, USA)
ATP13A2	Kaninchen, polyklonal	1:1000		Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
β -Aktin	Maus, monoklonal	1:5000		Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Cathepsin D	Maus, monoklonal	1:1000		Abcam (Cambridge, USA)
HSP60	Ziege, polyklonal	1:2000	1:500	Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)
LAMP 1	Kaninchen, monoklonal		1:100	Cell Signaling (Boston, MA, USA)
LAMP 2	Maus, monoklonal	1:1000	1:250	Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa City, IA, USA)
LAMP 2	Kaninchen, polyklonal		1:100	Cell Signaling (Boston, MA, USA)
NRF1	Maus, monoklonal	1:500	1:200	Abcam (Cambridge, USA)
PGC-1	Kaninchen, polykolonal	1:1000		Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)
PRK8	Maus, monoklonal		1:1000	Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)
TIMM44	Maus, monoklonal	1:1000		BD Transduction Laboratories (Heidelberg, Deutschland)
TOM20	Kaninchen, polyklonal		1:1000	Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)
VDAC	Maus, monoclonal	1:1000		Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)
V5	Maus, monoklonal	1:5000	1:500	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
V5	Kaninchen, polyklonal		1:500	Millipore (Darmstadt, Deutschland)

6.1.5.2 Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Spezies	WB	IF	Hersteller
α -Maus Alexa 488	Ziege		1:500	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
α -Kaninchen Alexa 488	Ziege		1:500	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
α -Maus Alexa 555	Ziege		1:500	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
α -Kaninchen Alexa 555	Ziege		1:500	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
α -Maus IgG HRP	Ziege	1:12000		Promega (Mannheim, Deutschland)
α -Kaninchen IgG HRP	Ziege	1:12000		Promega (Mannheim, Deutschland)

6.1.6 Farbstoffe und Marker

Name	Hersteller
DAPI	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
1 kb DNA Ladder	New England Biolabs (Schwalbach, Deutschland)
6x DNA Load	0,25% Bromphenolblau, 30% Glyzerin
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
SYBRGreen PCR Master Mix	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)

6.1.7 Kits

Name	Hersteller
ATP Bioluminescence Assay Kit HS II	Roche (Mannheim, Deutschland)
DNA Midi Extraktionskit	Machery Nagel (Düren, Deutschland)
ECL/ECL+	GE Healthcare (München, Deutschland)

EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin	Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA)
In-Fusion HD Cloning Kit	Clontech (Mountain View, CA, USA)
iScript cDNA Synthese Kit	Biorad (München, Deutschland)
Luciferase Reporter Assay	Promega (Madison, WI, USA)
Nucleospin Gelextraktions Kit	Machery Nagel (Düren, Deutschland)
Nucleospin Plasmid Mini Kit	Machery Nagel (Düren, Deutschland)
Quick-gDNA Mini Prep	Zymo Research Corp. (Freiburg, Deutschland)
RNAse free DNase Kit	Quiagen (Hilden, Deutschland)
RNeasy RNA Extraktions Kit / Quiagen (Hilden, Deutschland)	

6.1.8 Toxine und Inhibitoren

Name	Anwendung	Hersteller
Bafilomycin	25 - 40 nM, 8 - 24 h	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
CCCP	10 μ M, 1 - 24 h	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Epoxomycin	0,1 μ M, 1-24 h	Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)
MnCl ₂	1 μ M, 8-24 h	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
MPP ⁺ iodid	2 μ M, 1-24 h	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Rotenone	1 μ M, 3-24 h	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Staurosporin	1 μ M, 3 h	Axxona (Lörrach, Deutschland)
Thapsigargin	5 μ M; 8 - 24 h	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

6.1.9 Puffer und Reagenzien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalie und Reagenzien von folgenden Firmen bezogen: Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Boehringer (Mannheim, Deutschland), Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), USB (Cleveland, USA).

Für die Herstellung sämtlicher Puffer und Lösungen wurde Wasser verwendet, dass durch die MilliQ Deionisierungsanlage der Firma Millipore (Eschborn, Deutschland) mit einem Widerstand von 18,2 M Ω /cm³ gefiltert wurde.

Name	Hersteller bzw. Zusammensetzung
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	10% in H ₂ O bidest.
BC Assay Reagent A+B	Uptima Interchim (St. Augustin-Buisdorf, Deutschland)
Blocking Puffer für die Immunfluoreszenz	2,5% BSA in PBS
Eindeckelmedium für Immunfluoreszenz	Pro 20 mL: 6 g Glycerin, 2.4 g Mowiol, 0,12 M TRIS pH 8.5
Laemmli Probenpuffer	4x: 240 mM TRIS pH 6,8, 4% SDS, 40% Glycerol, Bromphenolblau
Lysepuffer	1% Triton X-100 in PBS
PBS	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,3
PFA	10% Formaldehyd in PBS
Poly-L-Lysin	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Quenching Puffer	50 mM NH ₄ Cl + 0,2% Triton X 100
Sammelgelpuffer	pH 6,8, 0,5 M TRIS, 0,4% SDS
SDS Gellaufpuffer	25 mM TRIS, 0,189 M Glycine, 1% SDS
Stripping Puffer für Western Blot	1% Tween 20, 1% SDS, 0.2 M Glycin pH 2.2
TBE-Puffer	89 mM TRIS, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA pH 8.0
TBST	0,14 M NaCl, 0,02 M TRIS pH 7.6, 0,1% Tween 20
Transferpuffer Western Blot	24,9 mM Tris, 0,192 mM Glycine
Trenngelpuffer	pH 8,8, 1,5 M TRIS, 0,4% SDS
Urea	8 M Urea in H ₂ O bidest.

6.1.10 Geräte

Name	Hersteller
Analysenwaage Mettler Toledo AG285	Mettler-Toledo GmbH (Gießen, Deutschland)
Filmentwickler	CaWo (Schrobenhausen, Deutschland)

Inkubatoren für Zellkultur	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Kühlzentrifugen	Heraeus (Hanau, Deutschland); Eppendorf (Hamburg, Deutschland); Beckmann (Krefeld, Deutschland)
Kultur-Schüttler Forma Scientific 4518	ThermoQuest (Egelsbach, Deutschland)
Laborwaage Mettler Toledo PB602	Mettler-Toledo GmbH (Gießen, Deutschland)
Luminometer LB96V	Berthold Technologies (Bad Wildbad, Deutschland)
pH-Meter	Fischer Scientific (Nidderau, Deutschland)
Nano Photometer	Implen (München, Deutschland)
Neubauer Zählkammer	LO-Laboroptik (Friedrichsdorf, Deutschland)
Reinstwasseranlage MilliQ	Millipore (Eschborn, Deutschland)
Schüttler	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Thermoschüttler	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
UV-Tisch	UVP (Cambridge, UK)
Vortexer	Bender & Hobein (Zürich, CH)
Wasserbad MT	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Western Blot Entwickler	CaWo (Schrobenhausen, Deutschland)
Zentrifugen	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Mikroskope:	
Axiovert 200M	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Zeiss LSM 710	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
PCR-Geräte:	
Fast Real Time System 7500	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
Mastercycler	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
MicroAmp RT-PCR Platten	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
T3 Thermocycler	Biometra GmbH (Göttingen, Deutschland)

6.1.11 Software

Name	Hersteller
Axiovision	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
DiAlign TF	Cartharius et al., 2005
Excel 2010	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
Illustrator	Adobe Systems GmbH (München, Deutschland)
Photoshop CS5	Adobe Systems GmbH (München, Deutschland)
Sequence Retrieval Database Elorado 08-2011	Genomatix (München, Deutschland)
Fast Real Time System 7500	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
WinGlow	Berthold Technologies (Bad Wildbad, Deutschland)
Zen 2010	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)

6.2 Methoden

6.2.1 Zellkultur

6.2.1.1 Kultivierung von Zellen

6.2.1.1.1 Kultivierung verschiedener Zelllinien

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden drei verschiedene humane Zelllinien, SH-SY5Y, HEK und HeLa-Zellen, sowie immortalisiert und primäre murine embryonale Fibroblasten (MEF) und primäre kortikale Neuronen von Mäuseembryonen verwendet. Alle Zelllinien wurden als *Monolayer* in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37°C in angefeuchteter Atmosphäre und 5% CO₂ kultiviert. Um die Zellen zu passagieren wurden sie, bis auf die primären kortikalen Neuronen, in regelmäßigen Abständen zweimal die Woche geteilt. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA vom Flaschenboden abgelöst und in frischem Medium in geeignetem Teilverhältnis in eine neue Zellkulturflasche überführt.

6.2.1.1.2 Präparation primärer muriner embryonaler Fibroblasten

Murine embryonale Fibroblasten wurden aus 14,5 dpc (= *days post coitum*) alten Wildtyp Bl6/C57 J Embryonen präpariert. Die schwangere Maus wurde durch zervikale Dislokation getötet, die Embryonen entnommen und in PBS überführt. Von den Embryonen wurden der Kopf sowie sämtliche rote Organe (Leber, Herz) entfernt. Der restliche Embryo wurde mit PBS ge-

waschen und mittels eines Skalpells in einer Petrischale so klein wie möglich zerteilt. Um eine homogene Zellsuspension zu erhalten, wurde das Gewebe für 5-10 min bei 37°C in Trypsin inkubiert und Zellagglomerate anschließend durch mehrmaliges Pipettieren zerteilt. Die erhaltene Zellsuspension wurde in frischem Medium in 10 cm Zellkulturschalen ausplattiert. Nach 16-24 h wurde das Medium gewechselt. Primäre MEFs wurden maximal 2x passagiert.

6.2.1.1.3 Präparation primärer kortikaler Neuronen aus Mäuseembryos

Um den primären kortikalen Neuronen optimale Wachstumsbedingung zu liefern, wurden sie auf Poly-L-Lysin beschichteten Platten ausplattiert. 3,5 cm Schalen wurden mit 1,5 mL einer durch einen $0,2\ \mu\text{m}$ Polyethylenstyrol-Filter steril filtrierten $100\ \mu\text{g/mL}$ Poly-L-Lysin Lösung beschichtet. Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur wurden sie 3x mit deionisiertem, autoklaviertem Wasser gewaschen. Die Isolierung primärer kortikaler Neuronen erfolgte aus 14,5-15,5 dpc (*days post coitum*) alten Embryonen. Die schwangere Maus wurde durch zervikale Dislokation getötet, die Embryonen entnommen und in PBS überführt. Die Gehirne wurden entnommen, die Meningen entfernt und die Kortizes in HBSS+10 mM HEPES überführt. Zur Dissoziation der Zellen wurden die Kortizes in sterilfiltriertem Papain-Medium (DMEM GlutaMax) 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert, 1x mit Medium (DMEM GlutaMax + 10% FKS) gewaschen und anschließend in 3 mL Medium 10-20x mit einer 2 mL serologischen Pipette tituiert. Nach dem Sedimentieren der nicht vereinzelt Gewebeteile wurde der Überstand abgenommen und 5 min bei 4°C und 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen und die Neuronen in frischem Medium resuspendiert, in der Neubauer Zählkammer gezählt und in einer Zelldichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen pro 3,5 cm Schale ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C für 3 h im Brutschrank inkubiert, bevor das Medium gegen 2 mL Neurobasal+B27+Pen/Strep getauscht wurde. Die primären Neuronen wurden 3–5 Tage in Kultur gehalten, bevor sie für Experimente verwendet wurden.

6.2.1.2 Transiente Transfektion

6.2.1.2.1 Ausplattieren von Zellen

Für die Experimente wurden in einem ersten Schritt die Zellen ausplattiert. Die ausplattierte Zelldichte hing dabei von der Expressionszeit der DNA Konstrukte oder der experimentellen Fragestellung ab. Die Zellzahl in Medium wurde mittels Neubauer Zählkammer bestimmt und so eine genaue Zellzahl pro 3,5 cm Schale ausplattiert werden. Es wurden für HEK293T $3\text{--}5 \times 10^5$, für SH-SY5Y $2,5\text{--}5 \times 10^5$ und für HeLa 5×10^5 Zellen in 2 mL Medium ausplattiert. Immortalisierte MEFs wurden in einer Dichte von 5×10^5 Zellen ausplattiert, primäre MEFs in einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen in 2 mL Medium. Für 12-Well Platten wurde die Zellzahl entsprechend des Flächenverhältnisses reduziert. Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Zellen auf sterilen Glasplättchen in 3,5 cm-Schalen ausplattiert.

6.2.1.2.2 Überexpression unterschiedlicher DNA-Konstrukte

Die transiente Transfektion der DNA-Konstrukte mittels Lipofectamin erfolgte 24 h nach dem Ausplattieren. Dafür wurden folgende Mischungen (pro 3,5 cm Schale) angesetzt:

A		B	
Opti-MEM	100 μ L	Opti-MEM	100 μ L
DNA	0,2-1 μ g	Lipofectamin	8 μ L (HEK), 6 μ L (SH-SY5Y)
Plus-Reagenz	6 μ L (HEK), 8 μ L (SH-SY5Y)		

Beide Mischungen wurden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend gemischt und wiederum 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der ersten Inkubationszeiten wurden die Zellen zweimal mit Opti-MEM gewaschen und anschließend 800 μ L Opti-MEM auf die Zellen gegeben. Nach Ende der Inkubationszeit wurden 200 μ L Transfektionsmischung tropfenweise zu den Zellen zugegeben und alles durch Schwenken vorsichtig gemischt. Nach dreistündiger Inkubationszeit wurde das Transfektionsmedium gegen 2 mL normales Medium ausgetauscht. Je nach DNA-Konstrukt erfolgte die Zellernte nach 24-48 h.

6.2.1.2.3 Transiente Transfektion von siRNA

Für die Reduktion von Proteinmengen wurde die Methode der RNA-Interferenz mittels *Stealth Select RNAi small interfering RNA (siRNA)* angewendet. Als Kontrolle wurde die entsprechende *Stealth RNAi siRNA Negative Control* mit passendem GC-Gehalt verwendet. Die Ausgangskonzentrationen der siRNAs betrugen immer 20 μ M. Die Transfektion der siRNA erfolgte revers, das heißt Zellsuspension und Transfektionsmischung wurden parallel ausplattiert. Dafür wurde folgende Mischung (pro 3,5 cm Schale) angesetzt:

Reagenz	Volumen
Opti-MEM	500 μ L
siRNA	2-10 μ L
RNAiMax	5-10 μ L

Während der Inkubationszeit wurden die Zellen abtrypsiniert und in Opti-MEM sorgfältig resuspendiert. Die gewünschte Zelldichte wurde nach Auszählung mit der Neubauer-Zählkammer in Opti-MEM eingestellt und 1,5 mL Zellsuspension pro 3,5 cm Schale ausplattiert. Die Transfektionsmischung wurde tropfenweise zugegeben und durch vorsichtiges Schwenken mit der Zellsuspension gemischt. Nach dreistündiger Inkubationszeit wurde das Transfektionsmedium gegen 2 mL normales Medium ausgetauscht. Je nach siRNA erfolgte die Zellernte nach 48-72 h.

Für eine Reduktion der ATP13A2 Level wurden zwei verschiedene siRNAs kombiniert und je 2 μL pro siRNA eingesetzt. Eine Reduktion von PGC-1 α und PGC-1 β Level wurde durch den kombinierten Einsatz von je 5 μL siRNA gegen PGC-1 α und PGC-1 β erreicht.

6.2.1.3 stabile Transduktion

6.2.1.3.1 Generierung stabiler ATP13A2 *Knockdown*-Zellen

Für Untersuchungen zu Mitophagie wurden HeLa-Zellen mit einem stabilen *Knockdown* von ATP13A2 generiert. Hierfür wurde die Methode der RNA Interferenz mittels *short hairpin RNA* (shRNA) verwendet. Verschiedene spezifische konstruierte und synthetisierte shRNA-Sequenzen sowie eine entsprechende Kontrollsequenz wurden in den Expressionsvektor pLKO I kloniert. Mit diesen Expressionskonstrukten wurde eine Transfektion von Helferzellen in 3,5 cm Schalen durchgeführt. Da durch diesen Transfektionsprozess Lentiviren entstehen, wurden alle Arbeiten in der S2-Zellkultur durchgeführt. Folgende Mischung (pro 3,5 cm Schale) wurden angesetzt:

A		B	
Opti-MEM	500 μL	Opti-MEM	500 μL
ps-PAX2	0,5 μg	Lipofectamin 2000	6,3 μL
VSV-G	0,5 μg		
Kontrolle/pLKO I-shRNA	1,15 μg		

Beide Mischungen wurden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend gemischt und wiederum 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die Helferzellen abtrypsinisiert und in einem Verhältnis von 1:10 in OptiMEM+10% FKS sorgfältig resuspendiert. Die Transfektionsmischung wurde tropfenweise zu 1 mL Zellsuspension pro 3,5 cm Schale hinzu pipettiert und durch vorsichtiges Schwenken mit der Zellsuspension gemischt. Nach 24 h wurde das Transfektionsmedium gegen 2 mL Kultivierungsmedium ausgewechselt. Die Transfektion der Zielzellen mit den entstandenen, sich im Überstand befindlichen Lentiviren erfolgte weitere 24 h später. Die Zielzellen wurden trypsinisiert und bei 1000 rpm 5 min lang abzentrifugiert, in etwas Kultivierungsmedium aufgenommen und in 3,5 cm Schalen ausplattiert. Der Überstand der Helferzellen wurde mit einer 1 mL Spritze abgenommen und durch einen 0,45 μm Sterilfilter auf die Zielzellen filtriert. Die Zellen wurden wie oben beschrieben weiterpassagiert. Die *Knockdown*-Effizienz wurde mittels RT-PCR überprüft.

6.2.1.3.2 Generierung stabiler ATP13A2 Überexpressions-Zellen

Für Untersuchungen zur Mitophagie wurden HeLa-Zellen mit einer stabilen Überexpression von ATP13A2 verwendet. Wildtyp ATP13A2 wurde in den Expressionsvektor Fu Δ Zeo-Vektor kloniert. Als Kontrolle diente GFP. Die Transfektion der Helferzellen und Transduktion der Zielzellen erfolgte wie für den stabilen *Knockdown* auch (siehe oben). Die Transfektionseffizienz wurde

mittels *Western Blot* überprüft.

6.2.1.4 Bestimmung der Wachstumsrate mittels Zellzählung

Die Wachstumsrate der Zellen wurde mittels Auszählung über die Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierfür wurden SH-SY5Y-Zellen reverse mit ATP13A2-siRNA wie beschrieben transfiziert und in 6-Well Platten in einer Zelldicht von 1×10^5 Zellen ausplattiert und für 24, 48, 72 und 96 h wachsen gelassen. Die Zellen wurden nach den angegebenen Zeitpunkten in 1 mL PBS geerntet und sechs Aliquots in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

6.2.1.5 Behandlung der Zellen mit Toxinen und Inhibitoren

Zellen wurden mit unterschiedlichen Toxinen und Inhibitoren behandelt. Dafür wurden die verschiedenen Reagenzien in der gewünschten Endkonzentration im Zellmedium verdünnt und durch Schwenken sorgfältig vermischt. Das Hungern der Zellen wurde durch Wechseln des Mediums auf HBSS Medium erreicht. Hierfür wurden die Zellen zweimal mit HBSS Medium gewaschen und abschließend 2 mL HBSS Medium hinzugefügt.

6.2.1.6 Zellernte

Für die weitere experimentelle Analyse der Zellen wurden diese erst geerntet. Die Zellen wurden zweimal mit 2 mL PBS gewaschen, anschließend in 1 mL PBS abgeschabt und resuspendiert. Die Zellen wurden bei 5000 rpm für 10 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert oder bei -20°C eingefroren.

6.2.2 Nukleinsäuremethoden

6.2.2.1 Klonierungen

6.2.2.1.1 DNA-Expressionskonstrukte

Wildtyp ATP13A2 in pcDNA 6 V5/His (A)

Wildtyp ATP13A2 wurde aus seinem Ursprungsvektor (von C. Kubisch) in einen pcDNA 6 V5/His (A) Vektor umklont, da das ursprüngliche Konstrukt sehr schlecht beschrieben war und keine praktikablen Schnittstellen enthielt. Dazu wurde die Wildtyp ATP13A2-Sequenz in zwei Stücken mit den Primerpaaren ATP13A2 wt pc6 *forward* 1/*reverse* 1 und ATP13A2 wt pc6 *forward* 2/*reverse* 2 aus seinem Ursprungsvektor mittels PCR amplifiziert. Die beiden Produkte wurden anschließend mittels *InFusion Cloning* in pcDNA 6 V5/His (A) kloniert. Im neuen Konstrukt sind zwei EcoR I-Schnittstellen sowie eine KOZAK-Sequenz enthalten.

ATP13A2 mit mutierter lysosomaler Signalsequenz pcDNA 6 V5/His (A)

Die kritischen Stellen der identifizierten lysosomalen Signalsequenz wurden mutiert. Dazu wurde

ein Teil von Wildtyp ATP13A2 mit dem Primerpaar ATP13A2 *forwardA/reverse A* aus seinem Ursprungsvektor mittels PCR amplifiziert. Das Produkt wurde mittels *InFusion Cloning* in den Vektor pcDNA 6 V5/His (A) kloniert. Das neue Konstrukt enthielt vor der Wildtyp-Sequenz eine EcoR V-Schnittstelle über die das Konstrukt erneut aufgeschnitten wurde und das synthetische Oligoribonukleotid ATP13A2 LSS über InFusion Cloning eingesetzt wurde. Das neue Konstrukt enthält eine KOZAK-Sequenz.

ATP13A2 Deletionskonstrukte 1A, 2A, 3A, 11, 21, 31, 12, 22, 32 in pcDNA 6 V5/His (A)

Zur Untersuchung des Einflusses des C- und N-Terminus von ATP13A2 wurden neun unterschiedliche Deletionskonstrukte ausgehend von Wildtyp ATP13A2 in pcDNA 6 V5/His (A) kloniert. Die stückweise an C- und N-Terminus verkürzten ATP13A2 Sequenzen wurden mit den Primerpaaren ATP13A2 Del *forward 1/ATP13A2 wt pc6 reverse 2*, ATP13A2 Del *forward 2/ATP13A2 wt pc6 reverse 2*, ATP13A2 Del *forward 3/ATP13A2 wt pc6 reverse 2*, ATP13A2 Del *forward 1/reverse 1*, ATP13A2 Del *forward 2/reverse 1*, ATP13A2 Del *forward 3/reverse 1*, ATP13A2 Del *forward 1/reverse 2*, ATP13A2 Del *forward 2/reverse 2*, ATP13A2 Del *forward 3/reverse 2* mittels PCR amplifiziert. Das PCR Produkt wurde anschließend mittels *InFusion Cloning* in pcDNA 6 V5/His (A) kloniert. In den Konstrukten sind zwei EcoR I-Schnittstellen sowie eine KOZAK-Sequenz enthalten.

ATP13A2 Promotor Reporter Konstrukt 1, 2, 3 in pGL4.23 Luc

Drei unterschiedlich lange Promotorstücke von ATP13A2 wurden mittels der Primerpaare ATP13A2 Promotor Reporter Konstrukt *forward 1/reverse*, ATP13A2 Promotor Reporter Konstrukt *forward 2/reverse* und ATP13A2 Promotor Reporter Konstrukt *forward 3/reverse* aus genomischer DNA aus SH-SY5Y-Zellen mittels PCR amplifiziert. Die PCR Produkte wurde anschließend mit den Restriktionsenzymen Kpn I und Hind III verdaut und in pGL4.23 Luc ligiert.

NRF1 Wildtyp in pcDNA 3.1 (+) oder pcDNA 6 V5/His (A)

Wildtyp NRF1 wurde aus cDNA amplifiziert und in pcDNA 3.1 (+) oder pcDNA 6 V5/His (A) kloniert. Dazu wurde Wildtyp NRF1 mit den Primerpaaren NRF1 wt *forward/reverse pc3.1* beziehungsweise NRF1 wt *forward/reverse pc6* mittels PCR amplifiziert. Die Produkte wurden anschließend mittels *InFusion Cloning* in pcDNA 3.1 (+) beziehungsweise pcDNA 6 V5/His (A) kloniert. In den Konstrukten sind zwei Xho I-Schnittstellen sowie eine KOZAK-Sequenz enthalten.

NRF1 DN 1-304 in pcDNA 6 V5/His (A)

NRF1 DN 1-304 wurde aus NRF1 Wildtyp pcDNA 6 V5/His (A) Vektor kloniert. Dazu wurde NRF1 DN 1-304 mit dem Primerpaar NRF1 wt *forward/NRF1 DN pc6 reverse* mittels PCR amplifiziert. Das Produkt wurde anschließend mittels *InFusion Cloning* in pcDNA 6 V5/His (A) kloniert.

kloniert. Das Konstrukt enthält zwei Xho I-Schnittstellen sowie eine KOZAK-Sequenz enthalten. Die Vektorkarten zu den beschriebenen Konstrukten befinden sich im Anhang.

6.2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die gewünschten DNA-Sequenzen für die unterschiedlichen Expressionskonstrukte wurden über die Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Dafür wurden je nach Anforderungen an die DNA-Sequenz zwei unterschiedliche Polymerasen verwendet. Für die Generierung der DNA Sequenzen Wildtyp ATP13A2, Wildtyp NRF1 sowie NRF1 DN 1-304 wurde die Pwo-DNA-Polymerase verwendet, für die ATP13A2 Promotor und Deletions-Sequenzen wurde die *Q5 High Fidelity* DNA-Polymerase verwendet. Daraus ergaben sich zwei verschiedene PCR-Ansätze:

Pwo-DNA-Polymerase		Q5-DNA-Polymerase	
Matrize	100 ng	5x Q5 reaction buffer	1x
dNTPs	0,25 mM	10 mM dNTP	0,5 μ L
Primer (forward/reverse)	10 pmol	Primer (forward/reverse) 10 μ M	1,25 μ L
Pwo-DNA-Polymerase	2,5 U	Tempate	100 ng in 25 μ L
Pwo PCR Mix	ad 40 μ L	Q5-DNA-Polymerase	0,25 μ L
		Q5 High GC Enhancer	5 μ L
		H ₂ O	ad 25 μ L
Gesamtvolumen	40 μ L	Gesamtvolumen	25 μ L

Folgende PCR-Protokolle wurden für die unterschiedlichen Polymerasen verwendet:

Pwo-DNA-Polymerase			
Wiederholung	Temperatur in °C	Reaktion	Zeit in min
1x	95	Denaturierung	02:00
28x	95	Denaturierung	00:30
	58-68	Primer Annealing	00:30
	72	Elongation	02:00 - 04:00
1x	72	End-Elongation	10:00
	4	Kühlung	

Q5-DNA-Polymerase

Wiederholung	Temperatur in °C	Reaktion	Zeit in min
1x	98	Denaturierung	00:30
33x	98	Denaturierung	00:10
	60-75	Primer Annealing	00:30
	72	Elongation	00:30 - 02:00
1x	72	End-Elongation	02:00
	4	Kühlung	

6.2.2.1.3 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

DNA wurde über eine Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die DNA-Proben wurden entsprechend ihrer Größe in 1%igen Ethidiumbromid Agarosegele durch angelegte Spannung von 100 V in TBE-Puffer der Größe nach aufgetrennt. Nach ausreichender Auftrennzeit von etwa 30 min konnten die DNA-Banden mittels UV-Licht (256 nm) sichtbar gemacht werden, aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des *Nucleospin Extract Kits* nach Herstellerangaben isoliert werden.

6.2.2.1.4 Restriktionsverdau

Der für die weiteren Klonierungsschritte notwendige Restriktionsverdau von Zielvektor und PCR Produkt erfolgte in 40 μL Gesamtvolumen unter Einsatz von 5 μg Vektor bzw. des gesamten PCR Produkts. Der Kontrollverdau von 4 μL DNA-Minipräparation erfolgte in 20 μL Gesamtvolumen. Restriktionsenzyme wurden in dem für das Enzym geeigneten Puffer nach Herstellerangaben bei 37°C für 2-16 h verwendet.

6.2.2.1.5 Ligation

Für die Ligation der ATP13A2 Promotor-Sequenzen in den pGL4.23 Luc Zielvektor wurde eine T4-DNA-Ligase verwendet. Ein Ansatz aus 2 μL 10x Ligationspuffer und 1 μL T4-DNA-Ligase sowie 5 μL linearisiertem Vektor und 12 μL PCR-Produkt wurde 16 h bei 16°C ligiert.

6.2.2.1.6 *InFusion Cloning*

InFusion Cloning ermöglicht eine sehr einfache und effiziente Klonierung von PCR-Produkten in den gewünschten, linearisierten Zielvektor in nur einem Schritt. Hierfür muss das PCR-Produkt mit speziellen Primern, die einen Überlapp von 15 bp komplementär zur Sequenz des Zielvektor aufweisen, amplifiziert werden. 100 ng PCR-Produkt und 50 ng linearisierter Vektor wurden mit 1 μL *InFusion HD Enzym Premix* gemischt, auf ein Gesamtvolumen von 5 μL mit deionisiertem Wasser aufgefüllt und 15 min bei 50°C inkubiert. 2,5 μL dieses *InFusion* Produkts wurden direkt

in Stellar kompetente Bakterien transformiert.

6.2.2.1.7 Transformation von DNA in kompetente Bakterien

Die klonierten DNA-Expressionskonstrukte wurden in kompetenten *E. coli* Bakterien vervielfältigt. 1-2,5 μL DNA bzw. 10 μL eines Ligationsansatzes wurden in 50 μL chemokompetente DH5- α *E. coli* Bakterien (Genotyp: supE44, Δlac169 , ($\phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M15}$), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1) oder Stellar kompetente Bakterien transformiert. DH5- α wurden 30 min auf Eis inkubiert, Stellar kompetente Bakterien hingegen nur 5 min. Ein Hitzeschock von 42°C für 60 sec erleichterte die Aufnahme der DNA in die Bakterien. Anschließend wurden die Bakterien erneut 15 bzw. 2 min auf Eis inkubiert, 300 μL LB bzw. SOC Medium zugegeben und die Bakteriensuspension für 1h bei 37°C geschüttelt. Die Suspension wurde auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

6.2.2.1.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolation der DNA-Expressionsvektoren erfolgte aus einer 3 oder 250 mL Über-Nacht-Flüssigkultur mit dem *Nucleospin Plasmid Mini Kit* oder dem *DNA Midi Extraktionskit* entsprechend den Herstellerangaben.

6.2.2.1.9 Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren am Nano Drop

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde am NanoDrop Photometer vermessen. Die Absorption der Nukleinsäuren bei 260 nm wurde mit dem Faktor 50 für DNA und dem Faktor 40 für RNA vom Gerät in die Konzentration in $\mu\text{g}/\text{mL}$ umgerechnet. Zur Abschätzung der Reinheit der Probe wurde die Absorption bei 280 nm gemessen, dem Bereich des Lichtes, in dem aromatische Aminosäuren ihr Absorptionsmaximum haben. Hierdurch können eventuelle Verunreinigungen der Probe mit Proteinen erkannt werden. Der Quotient $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ sollte für DNA $<1,7$ und für RNA $<2,0$ sein.

6.2.2.1.10 Isolierung von cDNA aus SH-SY5Y-Zellen

cDNA wurde aus SH-SY5Y-Zellen unter Verwendung des *Quick-gDNA Mini Prep Kits* nach Herstellerangaben isoliert.

6.2.2.2 RNA-Arbeiten

6.2.2.2.1 Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA aus Zellen erfolgte mit Hilfe des *RNeasy Mini Kits* nach Herstellerangaben. Eine Elimination von genomischer DNA erfolgte auf der Säule mittels DNase. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte per NanoDrop Photometer durch Messung der Absorption

bei 260 nm.

6.2.2.2.2 cDNA Synthese

cDNA wurde mittels Reverser Transkription aus 0,5 μg RNA mit *iScript cDNA Synthesis Kit* nach Herstellerangaben mit dem folgendem PCR Protokoll hergestellt:

Reaktion	Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Zeit in min
Inkubation	25	05:00
cDNA Synthese	42	30:00
RNA Hydrolyse	85	05:00
Kühlung	4	

6.2.2.2.3 Semi-quantitative *real-time*-PCR

Für die semi-quantitative *real-time*-Polymerase Kettenreaktion (RTPCR) wurden Exon-flankierende Primer mit einem PCR Produkt von 100-250 bp generiert, um eine ausschließliche Amplifizierung von cDNA zu gewährleisten. Als interne Kontrolle wurde β -Aktin, als Fluoreszenz-Marker für die RTPCR der Interkalator *SybrGreen* verwendet. Die unten aufgeführten Mischungen wurden für die RTPCR verwendet. Die Angaben für die Mischungen sind pro Well und wurden entsprechend der nötigen Well-Zahl als eine Stockmischung angesetzt. Die RTPCR wurde für jede Kombination aus Probe und Primer in Triplikaten durchgeführt.

	Komponenten	Volumen in μL
Non-template control (NTC)	H ₂ O	1,5
	SYBRGreen	10
cDNA Mix	cDNA	1,5
	SYBRGreen	10
Primer Mix	H ₂ O	7,5
	Primer (forward und reverse 5 pmol)	1

Alle Mischungen wurden gevortext und kurz zentrifugiert. In einer *MicroAmp* 96-Well Platte wurden 8,5 μL Primer Mix und 11,5 μL cDNA Mix bzw. NTC Mix zusammen pipettiert, die Platte für 1 min bei 1000 rpm zentrifugiert und mit dem *Fast Real Time System 7500* vermessen. Die cDNA Menge des Zielgens wurde auf β -Aktin normiert und die relative Expression mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode bezogen auf eine interne Kontrolle berechnet. Die Qualität der verwendeten Primer wurde mittels einer Schmelzkurve überprüft.

6.2.3 Proteinanalytische Methoden

6.2.3.1 Allgemeine Vorarbeiten

6.2.3.1.1 Zelllyse

Für die proteinbiochemische Analyse wurden Gesamtzellextrakte verwendet. Hierfür wurde das geerntete Zellpellet in 110-400 μL 1% Triton X 100 in PBS resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und abschließend gevortext. Für eine Bestimmung von ATP13A2 wurde das Zellpellet in 400 μL 4xLSB+8 M Urea (4:1) resuspendiert und zehnmal durch eine 0,6 mm Kanüle gezogen.

6.2.3.1.2 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der lysierten Proben wurde über einen BC *Assay* bestimmt. Eine Kalibrierkurve mit BSA sowie die Proben wurden nach Angaben des Herstellers mit jeweils 200 μL BCA Reagenz in einer 96-Well Platte gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Absorption wurde bei 562 nm am Plattenphotometer vermessen. Der Proteingehalt der Proben wurde mit Hilfe der Kalibrierkurve errechnet. Für immunhistochemische Nachweise wurden jeweils gleiche Proteinmengen zwischen 5-50 μg eingesetzt.

6.2.3.2 Western Blot

6.2.3.2.1 SDS-PAGE

Die zu untersuchenden Proteine wurden nach einer Auftrennung durch Sodium Dodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter denaturierenden Bedingungen analysiert. Die Proteine werden in SDS-Polyacrylamidgelen im elektrischen Feld ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt. Die Proben wurden mit Lämmli-Puffer+10% β -Mercaptoethanol versetzt und dann bei 95°C für 10 min gekocht. Proben für die Analyse von ATP13A2 wurden nicht gekocht. Es wurde je nach zu analysierendem Protein mit 10-15% Trenngelen mit 4% Sammelgelen gearbeitet. Für die Analyse von ATP13A2 wurde mit 7% Urea Trenngelen mit 4% Urea Sammelgelen gearbeitet.

Reagenzien	10% Trenngel	15% Trenngel	Sammelgel	Urea Trenngel	Urea Sammelgel
H ₂ O	4 mL	3 mL	3,3 mL	1,7 mL	0,75 mL
Puffer	2 mL	2 mL	1,25 mL	1,9 mL	1,25 mL
Acrylamid	2 mL	3 mL	0,5 mL	1,3 mL	0,5 mL
8 M Urea				2,6 mL	2,5 mL
TEMED	15 μ L	15 μ L	15 μ L	15 μ L	15 μ L
APS	15 μ L	15 μ L	15 μ L	15 μ L	15 μ L

Die Elektrophorese wurde in Biorad Mini-PROTEAN 3 Gelelektrophorese-Kammer in SDS-Gel Laufpuffer bei 25 mA pro Gel und begrenzter Spannung von 16 V durchgeführt. Die Laufzeit betrug zwischen 90 und 120 min.

6.2.3.2 Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen

Die aufgetrennten Proteine wurden bei konstantem Strom von 400 mA für 60 min auf Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membranen übertragen. Die PVDF Membranen wurden zuvor kurz mit Ethanol aktiviert. Unspezifische Bindestellen auf der Membran wurde nach Beendigung des Blotprozesses durch Schwenken in 5% Milchpulver in TBST für mind. 30 min bei Raumtemperatur geblockt. Die Membran wurde über Nacht in 4 mL Primärantikörper-Lösung in 50 mL Falcon-Röhrchen über Kopf im Kühlraum geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen in TBST für mindestens je 10 min wurde die Membran in 12 mL Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelter Sekundärantikörper-Lösung für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach abschließenden drei Waschschritten mit TBST für je 10 min wurden die Proteine mittels *Enhanced Chemiluminescence* (ECL) sichtbar gemacht. Die Reaktion der Peroxidase mit dem ECL Substrat führte zur Emission von Licht, das durch Exposition auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann.

6.2.3.3 Luziferase-Reporter-Assay

Die Aktivierung des ATP13A2 Promotors durch NRF1 und PGC-1 α wurde mittels eines Luziferase-Reporter-Assays analysiert. Hierfür wurden HEK-293T Zellen in 12-Well Platten ausplattiert und am folgenden Tag wie beschrieben transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet, das Pellet in 200 μ L *Reporter Lysis Buffer* resuspendiert, gevortext und für 10 min auf Eis inkubiert. Abschließend wurden die Proben 15 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Luziferase Signal wurde am Luminometer vermessen. In einer Oxidationsreaktion wird dabei Luziferin in Oxyluziferin und Licht umgesetzt, welches vermessen wird. 20 μ L Zelllysate wurden in eine schwarze 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert. Vom Luminometer wurden automatisch 100 μ L

Substrat für die Luziferase Reaktion direkt auf die Probe gegeben und das Signal über einen Zeitraum von 5 sec vermessen. Die Luziferaseaktivität der einzelnen Proben wurde auf ihren jeweiligen Proteingehalt normiert. Die Aktivität der internen Kontrolle wurde auf 1 gesetzt.

6.2.3.4 ATP-Assay

Die Analyse des ATP-Gehalts der Zellen erfolgte durch eine luminometrische Vermessung mit Hilfe des *ATP Bioluminescence Assay Kit HS II*. Mittels einer Oxidationsreaktion entsteht aus D-Luziferin und ATP Oxyluziferin und Licht. Hierfür wurden SH-SY5Y Zellen wie beschrieben mit siRNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde das Zellmedium gegen DMEM Medium ohne Glucose gewechselt. Weitere 24 h später wurde eine Probe für 3 h mit Rotenon gestresst und die Zellen abschließend geerntet. 100 μL der Zellsuspension wurden in *Cell Lysis Buffer* 5 min bei Raumtemperatur lysiert und anschließend bei 10000 rpm für 1 min zentrifugiert. 50 μL des Überstandes wurden in einer schwarzen 96-Well Mikrotiterplatte am Luminometer in Duplikaten vermessen. Vom Luminometer wurden automatisch 100 μL Substrat für die Oxidations-Reaktion direkt auf die Probe gegeben und das Signal über einen Zeitraum von 5 sec vermessen. Das Signal der einzelnen Proben wurde auf ihren jeweiligen Proteingehalt normiert. Der ATP-Gehalt der Kontrolle wurde auf 1 gesetzt.

6.2.3.5 Immunfluoreszenzfärbungen

Zur mikroskopischen Analyse wurden Proteine durch indirekte Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. Die auf den Glasplättchen ausplattierten und transfizierten Zellen wurden mit PBS gewaschen und 10 min in 3,7% PFA bei Raumtemperatur fixiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Zellen mit 0,2% Triton X 100 permeabilisiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Glasplättchen in eine feuchte Kammer überführt und mit jeweils 100 μL 2,5% BSA Lösung für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Die Zellen wurden in 85 μL Primärantikörper Verdünnung über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen wiederum in 85 μL Sekundärantikörper Verdünnung für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem sechsmaligem Waschen mit PBS wurden die Plättchen auf einem Objektträger mit Mowiol eingedeckt. Das Eindeckelmedium Mowiol enthielt den Farbstoff DAPI zur Anfärbung der Zellkerne. Die mikroskopischen Auszählungen erfolgten am Zeiss Axiovert Epifluoreszenzmikroskop. Bilder wurden mit dem konfokalen Mikroskop Zeiss LSM 710 und der dazu passenden Software Zen 2010 aufgenommen.

6.2.3.5.1 Caspase-Assay

Apoptotische Zellen wurden durch Anfärbung von aktivierter Caspase-3 nachgewiesen. Die Analyse der Färbungen und die Auszählung der aktiven Caspase-3 positiven Zellen erfolgten am Epifluoreszenzmikroskop. Pro Bedingung wurden mindestens 300 Zellen gezählt.

6.2.3.5.2 Untersuchung der mitochondrialen Morphologie

Die Analyse der mitochondrialen Morphologie erfolgte durch die Färbung des mitochondrialen Membranproteins TOM20. Die Analyse der Färbungen und die Auszählung der mitochondrialen Morphologie erfolgten am Epifluoreszenzmikroskop. Pro Deckgläschen wurden mindestens 300 Zellen verblindet ausgezählt und unterschiedlichen Kategorien zugeordnet. Normale, tubuläre Mitochondrien wurden als tubulär gekennzeichnet, Mitochondrien, die eine Kondensierung um die Kernregion aufwiesen, wurden als kondensiert klassifiziert. Zellen mit verkürzten Mitochondrien und mit fehlenden Ausläufern in die Zellperipherie wurden als "fragmentiert" klassifiziert. Pro Bedingung wurden mindestens 300 Zellen gezählt.

6.2.3.5.3 Mitophagie-*Assay*

Die Analyse der Mitophagie orientierte sich an der von Narendra *et al.* beschriebenen Methode. Stabile mit ATP13A2 Wildtyp oder ATP13A2 shRNA transduzierte HeLa Zellen wurden mit Parkin transfiziert. 3-16 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 1 und 24 h mit 10 μ M CCCP behandelt. Die mitochondriale Färbung erfolgte mit HSP60. Die angefärbten Zellen wurden am Epifluoreszenzmikroskop untersucht. Pro Deckgläschen wurden mindestens 300 transfizierte Zellen verblindet ausgezählt. Die Mitophagierate ergibt sich aus dem Quotient aus Zellen ohne Mitochondrien gegen die Gesamtzahl transfizierter Zellen. Pro Deckgläschen wurden mindestens 300 Zellen gezählt.

6.2.4 Promotoranalyse

Die bioinformatische Analyse des Promotors und die Ermittlung der enthaltenen NRF1 Bindestellen wurde freundlicherweise von Dr. Dietrich Trümbach, Institut für Entwicklungsgenetik, Helmholtz Zentrum München durchgeführt. Die Vorhersagen wurden für das Transkript NM_022089 durchgeführt. Alle Sequenzen stammen aus der *Promoter Sequence Retrieval Database Elorado 08-2011*. Die Promotor Sequenzen von ATP13A2 aus fünf verschiedenen Säugetierarten wurden mittels des *DiAlign TF Programms* in der *Genomatix Software GEMS Launcher* auf Sequenzhomologien hin verglichen, um Ähnlichkeiten in den Promotoren abzuschätzen und konservierte NRF1 (V\$NRF1.01) Bindestellen innerhalb der Promotoren zu identifizieren. Die Promotorsequenzen wurden wie in ElDorado definiert. *Position weight matrices* wurden für die Promotoranalyse dem Programm *Matrix Family Library Version 8.4* (Juni 2011) folgend verwendet. Bindestellen wurden als konserviert angesehen, wenn die humane Promotorsequenz im Bereich der NRF1 Bindestellen mit den Sequenzen der anderen Säugetierarten mit Hilfe des DiAlign TF Programms unter Verwendung einer Matrix Ähnlichkeit von opt. -0,05 in Einklang gebracht werden konnten.

6.2.5 Statistische Analyse

Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die statistische Analyse wurde unter Verwendung des Students t-Test erstellt. Die P-Werte betrugen * $p < 0,05$, ** $< 0,01$ und *** $< 0,001$.

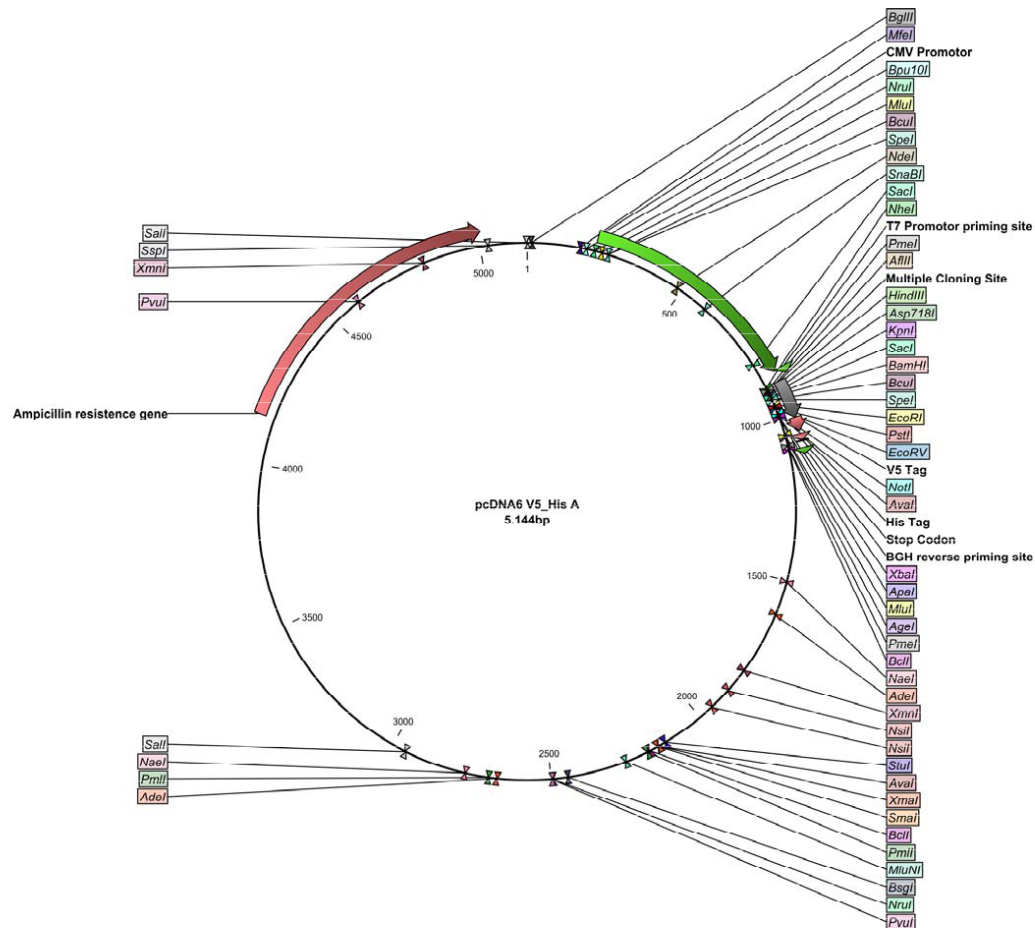
7 Formelzeichen und Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
aa	Aminosäure
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
°C	Grad Celcius
DAPI	4',6-Diamindino-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpc	<i>days post coitum</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhances Chemiluminescence</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKS	fötales Kälberserum
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunden
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HRP	<i>horseradish-peroxidase</i>
IF	Immunfluoreszenz
kB	Kilobasenpaare
kDa	kilo Dalton
KRS	Kufor-Rakeb-Syndrom
L	Liter
m	Meter
m	milli
min	Minuten
μ	mikro
n	nano
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
sec	Sekunden

shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
TBST	Tris-Buffered Saline and Tween 20
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	t-Octyl-Phenoxy-Polyethoxyethanol
Tween-20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
WB	Western Blot
wt	Wildtyp

8 Anhang

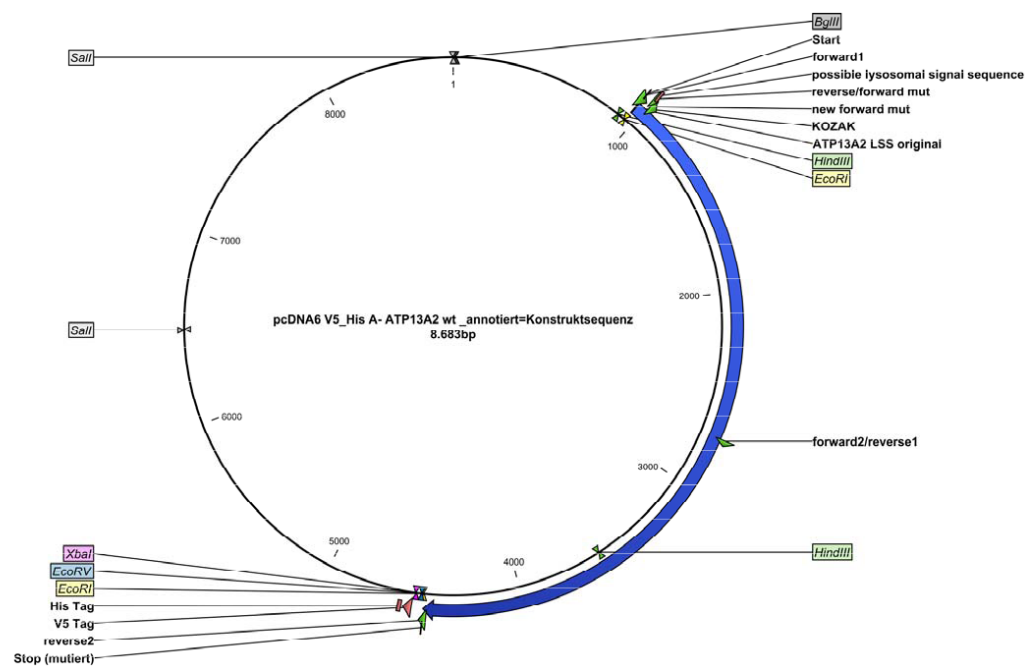
8.1 Vektorkarten



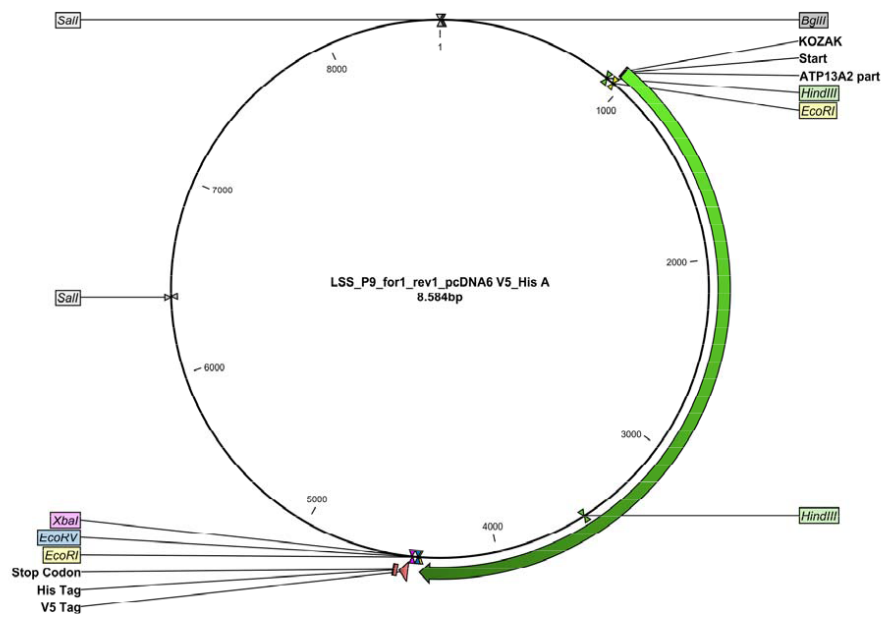
pcDNA6/V5-His A 5144 Nukleotide

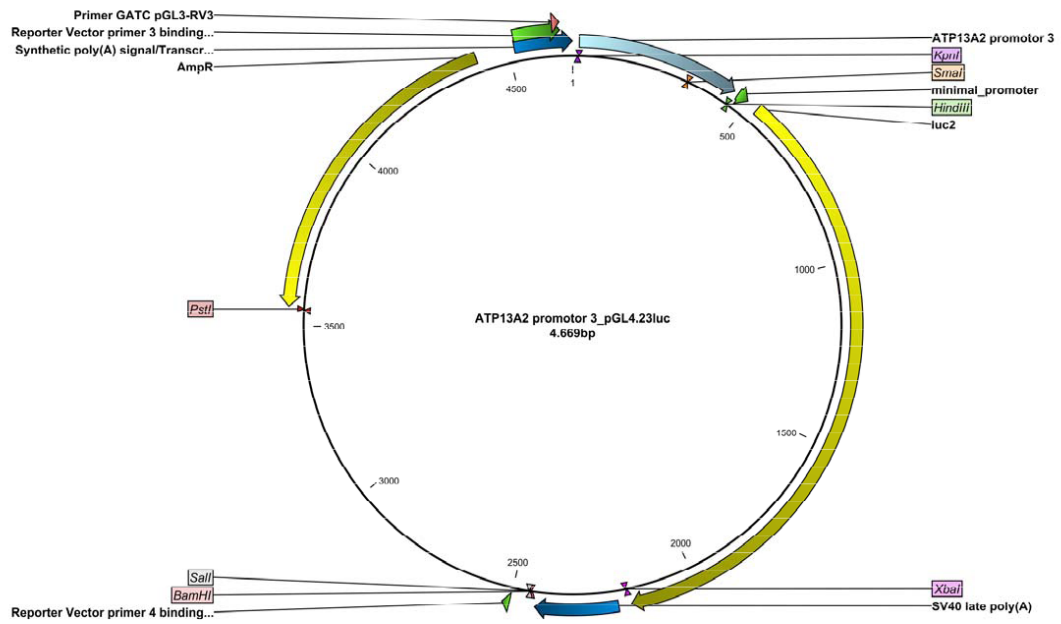
CMV promoter: bases 209-863
 T7 promoter priming site: bases 863-882
 Multiple cloning site: bases 895-1008
 V5 epitope: bases 1009-1050
 Polyhistidine tag: bases 1060-1077
 BGH reverse priming site: bases 1100-1117
 BGH polyadenylation sequence: bases 1103-1330
 f1 origin: bases 1376-1804
 SV40 promoter and origin: bases 1832-2139
 EM7 promoter: bases 2187-2242
 Blastocidin resistance gene (ORF): bases 2261-2659
 SV40 early polyadenylation sequence: bases 2817-2947
 pUC origin: bases 3330-4003
 Ampicillin resistance gene (ORF): bases 4148-5008

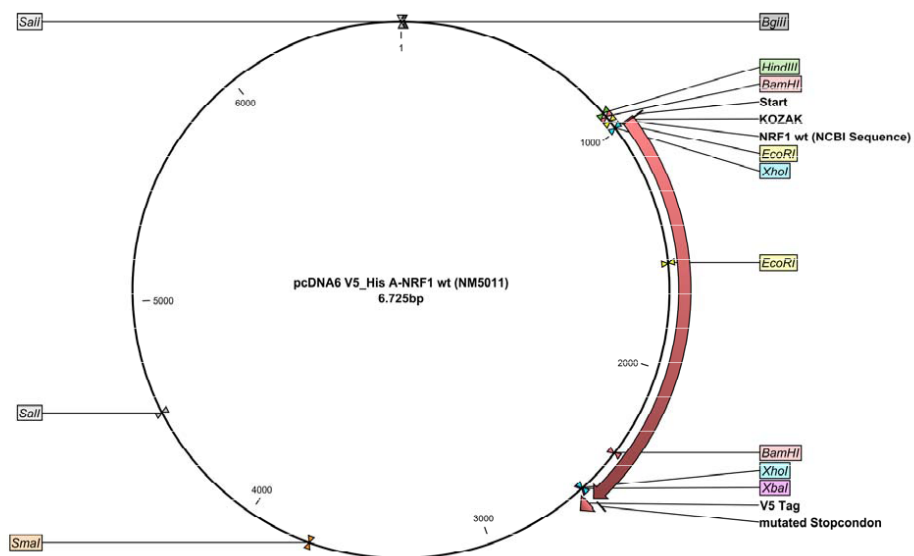
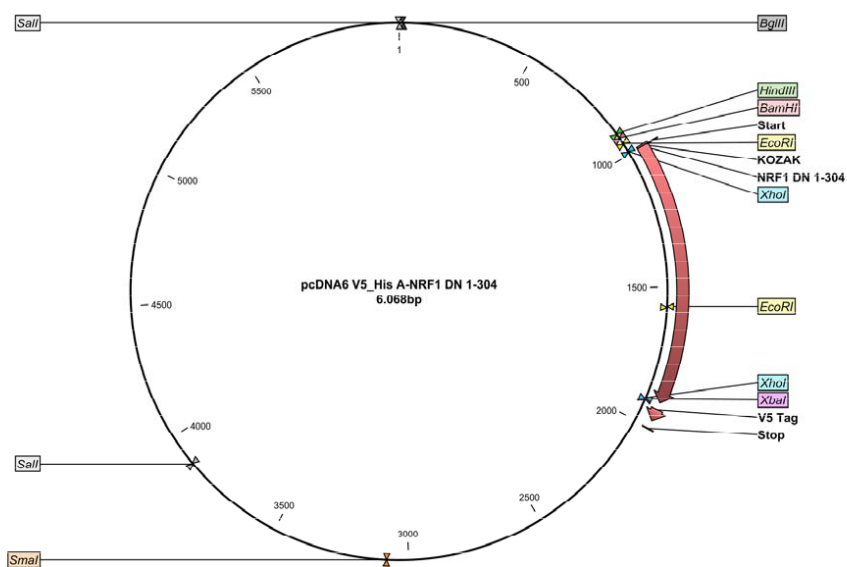
ATP13A2 Wildtyp in pcDNA 6 V5/His (A)



ATP13A2 Deletionskonstrukte in pcDNA 6 V5/His (A) (Beispiel ATP13A2 Del 11)



ATP13A2 Promotor Reporter Konstrukt in pGL4.23 Luc

NRF1 Wildtyp in pcDNA 6 V5/His (A)**NRF1 DN 1-304 in pcDNA 6 V5/His (A)**

8.2 Publikationen und Poster

8.2.1 Publikationen, die im Laufe dieser Arbeit entstanden sind

Regulation of ATP13A2 (Running Title)

Schweimer C, Welk V, Trümbach D, Müller-Rischart AK, Pils A, Tatzelt J, Winklhofer KF.

in Vorbereitung

The E3 ligase parkin maintains mitochondrial integrity by increasing linear ubiquitination of NE-MO.

Müller-Rischart AK, Pils A, Beaudette P, Patra M, Hadian K, Funke M, Peis R, Deinlein A, Schweimer C, Kuhn PH, Lichtenthaler SF, Motori E, Hrelia S, Wurst W, Trümbach D, Langer T, Krappmann D, Dittmar G, Tatzelt J, Winklhofer KF.

Molecular Cell. 2013 Mar 7;49(5):908-21

8.2.2 Poster, die im Laufe dieser Arbeit entstanden sind

Interact Munich 2013, München, Deutschland, 13.-14.03.2013:

ATP13A2 deficiency impairs mitochondrial integrity

Carolin Schweimer, Vanessa Welk, A. Kathrin Müller-Rischart, Anna Pils, Jörg Tatzelt, Konstanze F. Winklhofer

International Conference on Alzheimers Parkinsons disease: mechanisms, clinical strategies, and promising treatments of neurodegenerative diseases, Florenz, Italien, 6.-9.03.2013:

ATP13A2 deficiency impairs mitochondrial integrity

Carolin Schweimer, Vanessa Welk, A. Kathrin Müller-Rischart, Anna Pils, Jörg Tatzelt, Konstanze F. Winklhofer

9 Literaturverzeichnis

- S. Aits and M. Jaattela. Lysosomal cell death at a glance. *Journal of Cell Science*, 126(9): 1905–1912, 2013. ISSN 0021-9533. doi: 10.1242/jcs.091181.
- Aktories, Förstermann, Hofmann, and Starke, editors. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban&Fischer, 9 edition, 2005.
- A. Ala, A. Walker, K. Ashkan, J. Dooley, and M. Schilsky. Wilson’s disease. *The Lancet*, 369 (9559):397–408, 2007. ISSN 01406736. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60196-2.
- A. Albanese. Diagnostic criteria for parkinson’s disease. *Neurol Sci*, (24):23–26, 2003.
- T. Bartels, L. S. Ahlstrom, A. Leftin, F. Kamp, C. Haass, M. F. Brown, and K. Beyer. The n-terminus of the intrinsically disordered protein α -synuclein triggers membrane binding and helix folding. *Biophysical Journal*, 99(7):2116–2124, 2010. ISSN 00063495. doi: 10.1016/j.bpj.2010.06.035.
- M. I. Behrens, N. Brüggemann, P. Chana, P. Venegas, M. Kägi, T. Parrao, P. Orellana, C. Garrido, C. V. Rojas, J. Hauke, E. Hahnen, R. González, N. Seleme, V. Fernández, A. Schmidt, F. Binkofski, D. Kömpf, C. Kubisch, J. Hagenah, C. Klein, and A. Ramirez. Clinical spectrum of kufor-rakeb syndrome in the chilean kindred with atp13a2 mutations. *Movement Disorders*, 25(12):1929–1937, 2010. ISSN 08853185. doi: 10.1002/mds.22996.
- R. Bergeron, J. M. Ren, K. S. Cadman, I. K. Moore, P. Perret, M. Pypaert, L. H. Young, C. F. Semenkovich, and G. I. Shulman. Chronic activation of amp kinase results in nrf-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 281(6):1340–1346, 2001.
- R. Betarbet, T. B. Sherer, G. MacKenzie, M. Garcia-Osuna, A. V. Panov, and J. T. Greenamyre. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of parkinson’s disease. *Nat Neurosci.*, 12(3):1301–1306, 2000.
- J. R. Blesa, J. A. Prieto-Ruiz, B. A. Abraham, B. L. Harrison, A. A. Hegde, Hernández-Yago, and J. Nrf-1 is the major transcription factor regulating the expression of the human tomm34 gene. *Biochem Cell Biol.*, 86(1):46–56, 2008.
- E. Bondon-Guitton, S. Perez-Lloret, H. Bagheri, C. Brefel, O. Rascol, and J. Montastruc. Drug-induced parkinsonism: A review of 17 years’ experience in a regional pharmacovigilance center in france. *Movement Disorders*, 26(12):2226–2231, 2011. ISSN 08853185. doi: 10.1002/mds.23828.
- J. S. Bonifacino and L. M. Traub. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes *. *Annual Review of Biochemistry*, 72(1):395–447, 2003. ISSN 0066-4154. doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161800.

- V. Bonifati. Mutations in the dj-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*, 299(5604):256–259, 2002. doi: 10.1126/science.1077209.
- L. Bouman. A role of parkin in stress response pathways, 2010.
- L. Bouman, A. Schlierf, A. K. Lutz, J. Shan, A. Deinlein, J. Kast, Z. Galehdar, V. Palmisano, N. Patenge, D. Berg, T. Gasser, R. Augustin, D. Trümbach, I. Irrcher, D. S. Park, W. Wurst, M. S. Kilberg, J. Tatzelt, and K. F. Winklhofer. Parkin is transcriptionally regulated by atf4: evidence for an interconnection between mitochondrial stress and er stress. *Cell Death and Differentiation*, 18(5):769–782, 2010. ISSN 1350-9047. doi: 10.1038/cdd.2010.142.
- P. Boya and G. Kroemer. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene*, 27(50):6434–6451, 2008. ISSN 0950-9232. doi: 10.1038/onc.2008.310.
- G. Braidotti, I. A. Borthwick, and B. May. Identification of regulatory sequences in the gene for 5-aminolevulinate synthase from rat. *J Biol Chem*, 268(2):1109–1117, 1993.
- J. Bras, A. Verloes, S. A. Schneider, S. E. Mole, and R. J. Guerreiro. Mutation of the parkinsonism gene atp13a2 causes neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Human Molecular Genetics*, 21(12):2646–2650, 2012. ISSN 0964-6906. doi: 10.1093/hmg/dds089.
- T. Braulke and J. S. Bonifacino. Sorting of lysosomal proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1793(4):605–614, 2009. ISSN 01674889. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.10.016.
- H. Cam, E. Balciunaite, A. Blais, A. Spektor, R. C. Scarpulla, R. Young, Y. Kluger, and B. D. Dynlacht. A common set of gene regulatory networks links metabolism and growth inhibition. *Molecular Cell*, 16(3):399–411, 2004. ISSN 10972765. doi: 10.1016/j.molcel.2004.09.037.
- C. Cantó and J. Auwerx. Amp-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(20):3407–3423, 2010. ISSN 1420-682X. doi: 10.1007/s00018-010-0454-z.
- D. Carling, F. V. Mayer, M. J. Sanders, and S. J. Gamblin. Amp-activated protein kinase: nature’s energy sensor. *Nature Chemical Biology*, 7(8):512–518, 2011. ISSN 1552-4450. doi: 10.1038/nchembio.610.
- G. H. Cha, S. Kim, J. Park, E. Lee, M. Kim, S. B. Lee, J. M. Kim, J. Chung, and K. S. Cho. Parkin negatively regulates jnk pathway in the dopaminergic neurons of drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(29):10345–10350, 2005. ISSN 0027-8424.
- H. Chan, V. Babayan, E. Blyumin, C. Gandhi, K. Hak, D. Harake, K. Kumar, P. Lee, T. T. Li, H. Y. Liu, T. C. Lo, C. J. Meyer, S. Stanford, K. S. Zamora, and M. H. Saier. The p-type atpase superfamily. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 19(1-2):5–104, 2010. ISSN 1660-2412. doi: 10.1159/000319588.

- ch.embnet.org. http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/tmpred_form_parser. URL http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/TMPRED_form_parser.
- C. M. Chen, C. H. Lin, H. F. Juan, F. Hu, Y. C. Hsiao, H. Y. Chang, C. Y. Chao, I. C. Chen, L. C. Lee, T. W. Wang, Y. T. Chen, Y. T. Chen, G. J. Lee-Chen, and Y. R. Wu. Atp13a2 variability in taiwanese parkinson's disease. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 156(6):720–729, 2011. ISSN 15524841. doi: 10.1002/ajmg.b.31214.
- A. Chesi, A. Kilaru, X. Fang, A. A. Cooper, A. D. Gitler, and P. J. Kahle. The role of the parkinson's disease gene park9 in essential cellular pathways and the manganese homeostasis network in yeast. *PLoS ONE*, 7(3):e34178, 2012. ISSN 1932-6203. doi: 10.1371/journal.pone.0034178.
- Y. Chu, H. Dodiya, P. Aebischer, C. W. Olanow, and J. H. Kordower. Alterations in lysosomal and proteasomal markers in parkinson's disease: Relationship to alpha-synuclein inclusions. *Neurobiology of Disease*, 35(3):385–398, 2009. ISSN 09699961. doi: 10.1016/j.nbd.2009.05.023.
- I. E. Clark, M. W. Dodson, C. Jiang, J. H. Cao, J. R. Huh, J. H. Seol, S. J. Yoo, B. A. Hay, and M. Guo. Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature*, 441(7097):1162–1166, 2006. ISSN 00280836. doi: 10.1038/nature04779.
- P. G. Clarke and S. Clarke. Nineteenth century research on cell death. *Exp Oncol*, 34(3):139–145, 2012.
- J. P. Covy, E. A. Waxman, and B. I. Giasson. Characterization of cellular protective effects of atp13a2/park9 expression and alterations resulting from pathogenic mutants. *Journal of Neuroscience Research*, 90(12):2306–2316, 2012. ISSN 03604012. doi: 10.1002/jnr.23112.
- D. Crosiers, B. Ceulemans, B. Meeus, K. Nuytemans, P. Pals, C. van Broeckhoven, P. Cras, and J. Theuns. Juvenile dystonia-parkinsonism and dementia caused by a novel atp13a2 frameshift mutation. *Parkinsonism & Related Disorders*, 17(2):135–138, 2011. ISSN 13538020. doi: 10.1016/j.parkreldis.2010.10.011.
- A. M. Cuervo, L. Stefanis, R. Fredenburg, P. T. Lansbury, and D. Sulzer. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science*, 305(5688):1292–1295, 2004.
- C. A. da Costa, C. Sunyach, E. Giaime, A. West, O. Corti, A. Brice, S. Safe, P. M. Abou-Sleiman, N. W. Wood, H. Takahashi, M. S. Goldberg, J. Shen, and F. Checler. Transcriptional repression of p53 by parkin and impairment by mutations associated with autosomal recessive juvenile parkinson's disease. *Nature cell biology*, 11(11):1370–1375, 2009. ISSN 1476-4679. doi: 10.1038/ncb1981.

- F. Darios, N. Lambeng, J. D. Troadec, P. P. Michel, and M. Ruberg. Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death. *Human Molecular Genetics*, 12(5):517–526, 2003. ISSN 0964-6906. doi: 10.1093/hmg/ddg044.
- W. Dauer and S. Przedborski. Parkinson’s disease. *Neuron*, 39(6):889–909, 2003. ISSN 08966273. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00568-3.
- B. Dehay, J. Bove, N. Rodriguez-Muela, C. Perier, A. Recasens, P. Boya, and M. Vila. Pathogenic lysosomal depletion in parkinson’s disease. *Journal of Neuroscience*, 30(37):12535–12544, 2010. ISSN 0270-6474. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1920-10.2010.
- B. Dehay, A. Ramirez, M. Martinez-Vicente, C. Perier, M. H. Canron, E. Doudnikoff, A. Vital, M. Vila, C. Klein, and E. Bezaud. Loss of p-type atpase atp13a2/park9 function induces general lysosomal deficiency and leads to parkinson disease neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(24):9611–9616, 2012. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.1112368109.
- S. R. Denison, F. Wang, N. A. Becker, B. Schüle, N. Kock, La Phillips, C. Klein, and Di Smith. Alterations in the common fragile site gene parkin in ovarian and other cancers. *Oncogene*, 22(51):8370–8378, 2003. ISSN 0950-9232. doi: 10.1038/sj.onc.1207072.
- S. A. Detmer and D. C. Chan. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(11):870–879, 2007. ISSN 1471-0072. doi: 10.1038/nrm2275.
- S. S. Dhar, S. Ongwijitwat, and Wong-Riley, M. T. T. Nuclear respiratory factor 1 regulates all ten nuclear-encoded subunits of cytochrome c oxidase in neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 283(6):3120–3129, 2008. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M707587200.
- A. Di Fonzo, H. F. Chien, M. Socal, S. Giraudo, C. Tassorelli, G. Iliceto, G. Fabbrini, R. Marconi, E. Fincati, G. Abbruzzese, P. Marini, F. Squitieri, M. W. Horstink, P. Montagna, A. D. Libera, F. Stocchi, S. Goldwurm, J. J. Ferreira, G. Mecò, E. Martignoni, L. Lopiano, L. B. Jardim, B. A. Oostra, E. R. Barbosa, and V. Bonifati. Atp13a2 missense mutations in juvenile parkinsonism and young onset parkinson disease. *Neurology*, 68(19):1557–1562, 2007. ISSN 0028-3878. doi: 10.1212/01.wnl.0000260963.08711.08.
- A. Djarmati, J. Hagenah, K. Reetz, S. Winkler, M. I. Behrens, H. Pawlack, K. Lohmann, A. Ramirez, V. Tadić, N. Brüggemann, D. Berg, H. R. Siebner, A. E. Lang, P. P. Pramstaller, F. Binkofski, V. S. Kostić, J. Volkmann, T. Gasser, and C. Klein. Atp13a2 variants in early-onset parkinson’s disease patients and controls. *Movement Disorders*, 24(14):2104–2111, 2009. ISSN 08853185. doi: 10.1002/mds.22728.
- E. R. Dorsey, R. Constantinescu, J. P. Thompson, K. M. Biglan, R. G. Holloway, K. Kiebertz, F. J. Marshall, B. M. Ravina, G. Schifitto, A. Siderowf, and C. M. Tanner. Projected number

- of people with parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*, 68(5):384–386, 2007. ISSN 0028-3878. doi: 10.1212/01.wnl.0000247740.47667.03.
- H. Ehringer and O. Hornykiewicz. Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. *Klin Wochenschr*, 1960:1236–1239. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13726012>.
- H. Eiberg, L. Hansen, L. Korbo, N. Im, K. Svenstrup, S. Bech, L. H. Pinborg, L. Friberg, H. Le, O. R. Olsen, and J. E. Nielsen. Novel mutation in atp13a2 widens the spectrum of kufor-rakeb syndrome (park9). *Clinical Genetics*, 82(3):256–263, 2012. ISSN 00099163. doi: 10.1111/j.1399-0004.2011.01745.x.
- M. J. Evans and R. C. Scarpulla. Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. characterization of upstream nrf-1, atf, and intron sp1 recognition sequences. *J Biol Chem*, 264(24):14361–14368, 1989.
- M. J. Evans and R. C. Scarpulla. Nrf-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells. *Genes & Development*, 4(6):1023–1034, 1990. ISSN 0890-9369. doi: 10.1101/gad.4.6.1023.
- N. Exner, B. Treske, D. Paquet, K. Holmstrom, C. Schiesling, S. Gisbert, I. Carballo-Carbajal, D. Berg, H. H. Hoepken, T. Gasser, R. Kruger, K. F. Winklhofer, F. Vogel, A. S. Reichert, G. Auburger, P. J. Kahle, B. Schmid, and C. Haass. Loss-of-function of human pink1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. *Journal of Neuroscience*, 27(45):12413–12418, 2007. ISSN 0270-6474. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0719-07.2007.
- N. Exner, A. K. Lutz, C. Haass, and K. F. Winklhofer. Mitochondrial dysfunction in parkinson’s disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *The EMBO Journal*, 31(14):3038–3062, 2012. ISSN 02614189. doi: 10.1038/emboj.2012.170.
- L. Fallon, C. M. Bélanger, A. T. Corera, M. Kontogiannia, E. Regan-Klapisz, F. Moreau, J. Voortman, M. Haber, G. Rouleau, T. Thorarinsdottir, A. Brice, van Bergen en Henegouwen, P. M. P., and E. A. Fon. A regulated interaction with the uim protein eps15 implicates parkin in egf receptor trafficking and pi(3)k-akt signalling. *Nature Cell Biology*, 8(8):834–842, 2006. ISSN 1465-7392. doi: 10.1038/ncb1441.
- Q. Z. Fei, L. Cao, Q. Xiao, T. Zhang, L. Zheng, X. J. Wang, G. Wang, H. Y. Zhou, Y. Wang, and S. D. Chen. Lack of association between atp13a2 ala746thr variant and parkinson’s disease in han population of mainland china. *Neuroscience Letters*, 475(2):61–63, 2010. ISSN 03043940. doi: 10.1016/j.neulet.2010.03.018.

- P. C. FitzGerald, A. Shlyakhtenko, A. A. Mir, and C. Vinson. Clustering of dna sequences in human promoters. *Genome Research*, 14(8):1562–1574, 2004. ISSN 1088-9051. doi: 10.1101/gr.1953904.
- C. Y. Fong, A. Rolfs, T. Schwarzbraun, C. Klein, and F. J. O’Callaghan. Juvenile parkinsonism associated with heterozygous frameshift atp13a2 gene mutation. *European Journal of Paediatric Neurology*, 15(3):271–275, 2011. ISSN 10903798. doi: 10.1016/j.ejpn.2011.01.001.
- A. H. Futerman and G. van Meer. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(7):554–565, 2004. ISSN 1471-0072. doi: 10.1038/nrm1423.
- S. Geisler, K. M. Holmström, D. Skujat, F. C. Fiesel, O. C. Rothfuss, P. J. Kahle, and W. Springer. Pink1/parkin-mediated mitophagy is dependent on vdac1 and p62/sqstm1. *Nature Cell Biology*, 12(2):119–131, 2010. ISSN 1465-7392. doi: 10.1038/ncb2012.
- A. D. Gitler, A. Chesi, M. L. Geddie, K. E. Strathearn, S. Hamamichi, K. J. Hill, K. A. Caldwell, G. A. Caldwell, A. A. Cooper, J. C. Rochet, and S. Lindquist. α -synuclein is part of a diverse and highly conserved interaction network that includes park9 and manganese toxicity. *Nature Genetics*, 41(3):308–315, 2009. ISSN 1061-4036. doi: 10.1038/ng.300.
- A. Grandinetti, D. M. Morens, D. Reed, and D. MacEachern. Prospective study of cigarette smoking and the risk of developing idiopathic parkinson’s disease. *Am J Epidemiol.*, 139(12):1129–1138, 1994.
- M. W. Gray. Mitochondrial evolution. *Science*, 283(5407):1476–1481, 1999. doi: 10.1126/science.283.5407.1476.
- J. C. Greene, A. J. Whitworth, I. Kuo, La Andrews, M. B. Feany, and L. J. Pallanck. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in drosophila parkin mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7):4078–4083, 2003. ISSN 0027-8424.
- A. Grünewald, B. Arns, P. Seibler, A. Rakovic, A. Münchau, A. Ramirez, C. M. Sue, and C. Klein. Atp13a2 mutations impair mitochondrial function in fibroblasts from patients with kufor-rakeb syndrome. *Neurobiology of Aging*, 33(8):1843.e1–1843.e7, 2012. ISSN 01974580. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.12.035.
- A. M. Gusdon, B. van Houten, and C. T. Chu. Atp13a2 regulates mitochondrial bioenergetics through macroautophagy. *Neurobiology of Disease*, 45(3):962–972, 2012. ISSN 09699961. doi: 10.1016/j.nbd.2011.12.015.
- D. R. Gutsaeva, M. S. Carraway, H. B. Suliman, I. T. Demchenko, H. Shitara, H. Yonekawa, and C. A. Piantadosi. Transient hypoxia stimulates mitochondrial biogenesis in brain subcortex by a neuronal nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Journal of Neuroscience*, 28(9):2015–2024, 2008. ISSN 0270-6474. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5654-07.2008.

- D. J. Hampshire, E. Roberts, Y. Crow, J. Bond, A. Mubaidin, A. L. Wriekat, A. Al-Din, and C. G. Woods. Kufor-rakeb syndrome, pallido-pyramidal degeneration with supranuclear upgaze paresis and dementia, maps to 1p36. *J Med Genet*, 38(10):680–682, 2001.
- D. Hanahan and M. Meselson. Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol*, 100: 333–342, 1983.
- M. E. Haque, K. J. Thomas, C. D’Souza, S. Callaghan, T. Kitada, R. S. Slack, P. Fraser, Cookson, A. Tandon, and D. Park. Cytoplasmic pink1 activity protects neurons from dopaminergic neurotoxin mptp. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(5):1716–1721, 2008. ISSN 0027-8424.
- J. Hardy, Cookson, and A. Singleton. Genes and parkinsonism. *The Lancet Neurology*, 2(4): 221–228, 2003. ISSN 14744422. doi: 10.1016/S1474-4422(03)00350-8.
- J. Hardy, P. Lewis, T. Revesz, A. Lees, and C. Paisan-Ruiz. The genetics of parkinson’s syndromes: a critical review. *Current Opinion in Genetics & Development*, 19(3):254–265, 2009. ISSN 0959437X. doi: 10.1016/j.gde.2009.03.008.
- T. Hasegawa, A. Treis, N. Patenge, F. C. Fiesel, W. Springer, and P. J. Kahle. Parkin protects against tyrosinase-mediated dopamine neurotoxicity by suppressing stress-activated protein kinase pathways. *Journal of Neurochemistry*, 105(5):1700–1715, 2008. ISSN 0022-3042. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05277.x.
- I. H. Henn, J. M. Gostner, P. Lackner, J. Tatzelt, and K. F. Winklhofer. Pathogenic mutations inactivate parkin by distinct mechanisms. *Journal of Neurochemistry*, 92(1):114–122, 2005. ISSN 0022-3042. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02854.x.
- I. H. Henn, L. Bouman, J. S. Schlehe, A. Schlierf, J. E. Schramm, E. Wegener, K. Nakaso, C. Culmsee, B. Berninger, D. Krappmann, J. Tatzelt, and K. F. Winklhofer. Parkin mediates neuroprotection through activation of i b kinase/nuclear factor- b signaling. *Journal of Neuroscience*, 27(8):1868–1878, 2007. ISSN 0270-6474. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5537-06.2007.
- A. J. Hughes, S. E. Daniel, L. Kilford, and A. J. Lees. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic parkinson’s disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 55(3):181–184, 1992.
- L. Huo and R. C. Scarpulla. Mitochondrial dna instability and peri-implantation lethality associated with targeted disruption of nuclear respiratory factor 1 in mice. *Mol Cell Biol*, 21(2): 644–654, 2001.
- I. Irrcher, H. Aleyasin, E. L. Seifert, S. J. Hewitt, S. Chhabra, M. Phillips, A. K. Lutz, M. W. Rousseaux, L. Bevilacqua, A. Jahani-Asl, S. Callaghan, J. G. MacLaurin, K. F. Winklhofer, P. Rizzu, P. Rippstein, R. H. Kim, C. X. Chen, E. A. Fon, R. S. Slack, M. E. Harper, H. M.

- McBride, T. W. Mak, and D. S. Park. Loss of the parkinson's disease-linked gene dj-1 perturbs mitochondrial dynamics. *Human Molecular Genetics*, 19(19):3734–3746, 2010. ISSN 0964-6906. doi: 10.1093/hmg/ddq288.
- S. Jäger, C. Handschin, J. St-Pierre, and B. M. Spiegelman. Amp-activated protein kinase (ampk) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of pgc-1alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(29):12017–12022, 2007. ISSN 0027-8424.
- S. M. Jin, M. Lazarou, C. Wang, La Kane, D. P. Narendra, and R. J. Youle. Mitochondrial membrane potential regulates pink1 import and proteolytic destabilization by parl. *The Journal of Cell Biology*, 191(5):933–942, 2010. ISSN 0021-9525. doi: 10.1083/jcb.201008084.
- K. Johar, A. Priya, and Wong-Riley, M. T. T. Regulation of na⁺/k⁺-atpase by nuclear respiratory factor 1: Implication in the tight coupling of neuronal activity, energy generation, and energy consumption. *Journal of Biological Chemistry*, 287(48):40381–40390, 2012. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M112.414573.
- B. N. Johnson, A. K. Berger, G. P. Cortese, and M. J. LaVoie. The ubiquitin e3 ligase parkin regulates the proapoptotic function of bax. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16):6283–6288, 2012. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.1113248109.
- F. Kamp and K. Beyer. Binding of α -synuclein affects the lipid packing in bilayers of small vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 281(14):9251–9259, 2006. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M512292200.
- F. Kamp, N. Exner, A. K. Lutz, N. Wender, J. Hegermann, B. Brunner, B. Nuscher, T. Bartels, A. Giese, K. Beyer, S. Eimer, K. F. Winklhofer, and C. Haass. Inhibition of mitochondrial fusion by α -synuclein is rescued by pink1, parkin and dj-1. *The EMBO Journal*, 29(20):3571–3589, 2010. ISSN 0261-4189. doi: 10.1038/emboj.2010.223.
- D. P. Kelly and R. C. Scarpulla. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes & Development*, 18(4):357–368, 2004. ISSN 0890-9369. doi: 10.1101/gad.1177604.
- J. F. Kerr, A. H. Wyllie, and A. R. Currie. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4):239–257, 1972.
- R. H. Kim, P. D. Smith, H. Aleyasin, S. Hayley, M. P. Mount, S. Pownall, A. Wakeham, A. J. You-Ten, S. K. Kalia, P. Horne, D. Westaway, Am Lozano, H. Anisman, D. S. Park, and T. W. Mak. Hypersensitivity of dj-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (mptp) and oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(14):5215–5220, 2005. ISSN 0027-8424.

- T. Kitada, S. Asakawa, N. Hattori, H. Matsumine, Y. Yamamura, S. Minoshima, M. Yokochi, Y. Mizuno, and N. Shimizu. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 392(6676):605–608, 1998. ISSN 00280836.
- S. M. Kong, B. K. Chan, J. S. Park, K. J. Hill, J. B. Aitken, L. Cottle, H. Farghaian, A. R. Cole, P. A. Lay, C. M. Sue, and A. A. Cooper. Parkinson’s disease-linked human park9/atp13a2 maintains zinc homeostasis and promotes a-synuclein externalization via exosomes. *Human Molecular Genetics*, 2014. ISSN 0964-6906.
- W. Kühlbrandt. Biology, structure and mechanism of p-type atpases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(4):282–295, 2004. ISSN 1471-0072. doi: 10.1038/nrm1354.
- B. C. Lai, S. A. Marion, K. Teschke, and J. K. Tsui. Occupational and environmental risk factors for parkinson’s disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 8(5):297–309, 2002. ISSN 13538020. doi: 10.1016/S1353-8020(01)00054-2.
- J. W. Langston, P. Ballard, J. W. Tetrud, and I. Irwin. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 219(4587):979–980, 1983.
- N. G. Larsson, J. Wang, H. Wilhelmsson, A. Oldfors, P. Rustin, M. Lewandoski, G. S. Barsh, and D. A. Clayton. Mitochondrial transcription factor a is necessary for mtdna maintance and embryogenesis in mice. *Nature Genetics*, 18(3):231–236, 1998. ISSN 1061-4036.
- L. M. d. Lau and M. M. Breteler. Epidemiology of parkinson’s disease. *The Lancet Neurology*, 5(6):525–535, 2006. ISSN 14744422. doi: 10.1016/S1474-4422(06)70471-9.
- A. J. Lees and A. B. Singleton. Clinical heterogeneity of atp13a2 linked disease (kufor-rakeb) justifies a park designation. *Neurology*, 68(19):1553–1554, 2007. ISSN 0028-3878. doi: 10.1212/01.wnl.0000265228.66664.f4.
- A. J. Lees, J. Hardy, and T. Revesz. Parkinson’s disease. *Lancet*, 373(9680):2055–2066, 2009.
- S. Lesage and A. Brice. Parkinson’s disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Human Molecular Genetics*, 18(R1):R48–R59, 2009. ISSN 0964-6906. doi: 10.1093/hmg/ddp012.
- C. H. Lin, E. K. Tan, M. L. Chen, L. C. Tan, H. Q. Lim, G. S. Chen, and R. M. Wu. Novel atp13a2 variant associated with parkinson disease in taiwan and singapore. *Neurology*, 71(21):1727–1732, 2008. ISSN 0028-3878. doi: 10.1212/01.wnl.0000335167.72412.68.
- J. Lin, P. H. Wu, P. T. Tarr, K. S. Lindenberg, J. St-Pierre, C. Y. Zhang, V. K. Mootha, S. Jäger, C. R. Vianna, R. M. Reznick, L. Cui, M. Manieri, M. X. Donovan, Z. Wu, M. P. Cooper, M. C. Fan, L. M. Rohas, Am Zavacki, S. Cinti, G. I. Shulman, B. B. Lowell, D. Krainc, and B. M. Spiegelman. Defects in adaptive energy metabolism with cns-linked hyperactivity in pgc-1a null mice. *Cell*, 119(1):121–135, 2004. ISSN 00928674. doi: 10.1016/j.cell.2004.09.013.

- Lopes da Fonseca, T., A. Correia, W. Hasselaar, van der Linde, HC, R. Willemsen, and T. F. Outeiro. The zebrafish homologue of parkinson's disease atp13a2 is essential for embryonic survival. *Brain Research Bulletin*, 90:118–126, 2013. ISSN 03619230. doi: 10.1016/j.brainresbull.2012.09.017.
- P. H. Lou, B. S. Hansen, P. H. Olsen, S. Tullin, M. P. Murphy, and M. D. Brand. Mitochondrial uncouplers with an extraordinary dynamic range. *Biochemical Journal*, 407(1):129, 2007. ISSN 0264-6021. doi: 10.1042/BJ20070606.
- A. K. Lutz, N. Exner, M. E. Fett, J. S. Schlehe, K. Kloos, K. Lammermann, B. Brunner, A. Kurz-Drexler, F. Vogel, A. S. Reichert, L. Bouman, D. Vogt-Weisenhorn, W. Wurst, J. Tatzelt, C. Haass, and K. F. Winklhofer. Loss of parkin or pink1 function increases drp1-dependent mitochondrial fragmentation. *Journal of Biological Chemistry*, 284(34):22938–22951, 2009. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M109.035774.
- J. Lytton, M. Westlin, and M. Hanley. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum ca-atpase family of calcium pumps. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 266(26):17067–17071, 1991.
- S. P. Markey, J. N. Johannessen, C. C. Chiueh, R. S. Burns, and M. A. Herkenham. Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature*, 311(5985):464–467, 1984. ISSN 00280836.
- J. Massano and K. P. Bhatia. Clinical approach to parkinson's disease: Features, diagnosis, and principles of management. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(6):a008870, 2012. ISSN 2157-1422. doi: 10.1101/cshperspect.a008870.
- N. Matsuda, S. Sato, K. Shiba, K. Okatsu, K. Saisho, C. A. Gautier, Y. S. Sou, S. Saiki, S. Kawajiri, F. Sato, M. Kimura, M. Komatsu, N. Hattori, and K. Tanaka. Pink1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits parkin to damaged mitochondria and activates latent parkin for mitophagy. *The Journal of Cell Biology*, 189(2):211–221, 2010. ISSN 0021-9525. doi: 10.1083/jcb.200910140.
- H. Matsui, F. Sato, S. Sato, M. Koike, Y. Taruno, S. Saiki, M. Funayama, H. Ito, Y. Taniguchi, N. Uemura, A. Toyoda, Y. Sakaki, S. Takeda, Y. Uchiyama, N. Hattori, and R. Takahashi. Atp13a2 deficiency induces a decrease in cathepsin d activity, fingerprint-like inclusion body formation, and selective degeneration of dopaminergic neurons. *FEBS Letters*, 587(9):1316–1325, 2013. ISSN 00145793. doi: 10.1016/j.febslet.2013.02.046.
- M. P. Mattson. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(2):120–129, 2000. ISSN 1471-0072.
- A. Meirhaeghe, V. Crowley, C. Lenaghan, C. Lelliott, K. Green, A. Stewart, K. Hart, S. Schinner, J. Sethi, G. Yeo, M. D. Brand, R. N. Cortright, S. O'Rahilly, C. Montague, and A. J. Vidal-Puig.

- Characterization of the human, mouse and rat pgc1 beta (peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 beta) gene in vitro and in vivo. *Biochemical Journal*, 373(1): 155–165, 2003. ISSN 0264-6021.
- L. Meng, R. Mohan, B. H. Kwok, M. Elofsson, N. Sin, and C. M. Crews. Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 31(18):10403–10408, 1999. ISSN 0027-8424.
- J. H. MENKES, M. ALTER, G. K. STEIGLEDER, WEAKLEY, and J. H. Sung. A sex-linked recessive disorder with retardation of growth, peculiar hair, and focal cerebral and cerebellar degeneration. *Pediatrics*, 29:764–779, 1962.
- M. M. Mihaylova and R. J. Shaw. The ampk signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nature Cell Biology*, 13(9):1016–1023, 2011. ISSN 1465-7392. doi: 10.1038/ncb2329.
- J. A. Mindell. Lysosomal acidification mechanisms *. *Annual Review of Physiology*, 74(1):69–86, 2012. ISSN 0066-4278. doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142317.
- H. Minoru, S. Koko, K. Keiko, T. Soichiro, N. Yuji, T. Koji, Y. Haruaki, K. Masataka, and O. Toshikazu. Epoxomicin, a new antitumor agent of microbial origin. *Journal of Antibiotics*, 45(11):1746–1752, 1992.
- J. Moffat, D. A. Grueneberg, X. Yang, S. Y. Kim, Am Kloepper, G. Hinkle, B. Piquari, T. M. Eisenhaure, B. Luo, J. K. Grenier, A. E. Carpenter, S. Y. Foo, S. A. Stewart, B. R. Stockwell, N. Hacohen, W. C. Hahn, E. S. Lander, D. M. Sabatini, and D. E. Root. A lentiviral rna library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell*, 124(6):1283–1298, 2006. ISSN 00928674. doi: 10.1016/j.cell.2006.01.040.
- S. E. Mole and R. E. Williams, editors. *GeneReviews - Neuronal Ceroid-Lipofuscinoses*. 2013.
- A. K. Müller-Rischart, A. Pils, P. Beaudette, M. Patra, K. Hadian, M. Funke, R. Peis, A. Deinlein, C. Schweimer, P. H. Kuhn, S. F. Lichtenthaler, E. Motori, S. Hrelia, W. Wurst, D. Trümbach, T. Langer, D. Krappmann, G. Dittmar, J. Tatzelt, and K. F. Winklhofer. The e3 ligase parkin maintains mitochondrial integrity by increasing linear ubiquitination of nemo. *Molecular Cell*, 49(5):908–921, 2013. ISSN 10972765. doi: 10.1016/j.molcel.2013.01.036.
- A. S. Najim al Din, A. Wriekat, A. Mubaidin, M. Dasouki, and M. Hiari. Pallido-pyramidal degeneration, supranuclear upgaze paresis and dementia: Kufor-rakeb syndrome. *Acta Neuropathol Scand*, 89(2):347–352, 1994. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8085432>.
- D. Narendra, A. Tanaka, D. F. Suen, and R. J. Youle. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of Cell Biology*, 183(5):795–803, 2008. ISSN 0021-9525. doi: 10.1083/jcb.200809125.

- D. Narendra, La Kane, D. N. Hauser, Im Fearnle, and R. J. Youle. p62/sqstm1 is required for parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; vdac1 is dispensable for both. *Autophagy*, 6(8):1090–1106, 2010a. ISSN 1554-8627. doi: 10.4161/auto.6.8.13426.
- D. P. Narendra, S. M. Jin, A. Tanaka, D. F. Suen, C. A. Gautier, J. Shen, Cookson, and R. J. Youle. Pink1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate parkin. *PLoS Biology*, 8(1):e1000298, 2010b. ISSN 1545-7885. doi: 10.1371/journal.pbio.1000298.
- Y. P. Ning, K. Kanai, H. Tomiyama, Y. Li, M. Funayama, H. Yoshino, S. Sato, M. Asahina, S. Kuwabara, A. Takeda, T. Hattori, Y. Mizuno, and N. Hattori. Park9-linked parkinsonism in eastern asia: Mutation detection in atp13a2 and clinical phenotype. *Neurology*, 70(Issue 16,Part 2):1491–1493, 2008. ISSN 0028-3878. doi: 10.1212/01.wnl.0000310427.72236.68.
- J. S. Oakhill, J. W. Scott, and B. E. Kemp. Structure and function of amp-activated protein kinase. *Acta Physiologica*, 196(1):3–14, 2009. ISSN 17481708. doi: 10.1111/j.1748-1716.2009.01977.x.
- K. A. O’Hagan, S. Cocchiglia, A. V. Zhdanov, M. M. Tambuwala, E. P. Cummins, M. Monfared, T. A. Agbor, J. F. Garvey, D. B. Papkovsky, C. T. Taylor, and B. B. Allan. Pgc-1alpha is coupled to hif-1alpha-dependent gene expression by increasing mitochondrial oxygen consumption in skeletal muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(7):2188–2193, 2009. ISSN 0027-8424.
- K. Okatsu, K. Saisho, M. Shimanuki, K. Nakada, H. Shitara, Y. S. Sou, M. Kimura, S. Sato, N. Hattori, M. Komatsu, K. Tanaka, and N. Matsuda. p62/sqstm1 cooperates with parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria. *Genes to Cells*, page no, 2010. ISSN 13569597. doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01426.x.
- S. J. Orenstein and A. M. Cuervo. Chaperone-mediated autophagy: Molecular mechanisms and physiological relevance. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21(7):719–726, 2010. ISSN 10849521. doi: 10.1016/j.semcdb.2010.02.005.
- Y. P. Ow, Green, Z. Hao, and T. W. Mak. Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(7):532–542, 2008. ISSN 1471-0072. doi: 10.1038/nrm2434.
- C. Paisán-Ruiz, S. Jain, E. W. Evans, W. P. Gilks, J. Simón, van der Brug, M. López de Munain, A. S. Aparicio, Am Gil, N. Khan, J. Johnson, J. Martinez, D. Nicholl, Im Carrera, A. S. Pena, R. d. Silva, A. Lees, J. F. Martí-Massó, J. Pérez-Tur, N. W. Wood, and A. B. Singleton. Cloning of the gene containing mutations that cause park8-linked parkinson’s disease. *Neuron*, 44(4): 595–600, 2004. ISSN 08966273. doi: 10.1016/j.neuron.2004.10.023.
- C. Paisán-Ruiz, R. Guevara, M. Federoff, H. Hanagasi, F. Sina, E. Elahi, S. A. Schneider, P. Schwingenschuh, N. Bajaj, M. Emre, A. B. Singleton, J. Hardy, K. P. Bhatia, S. Brandner, A. J. Lees, and H. Houlden. Early-onset l-dopa-responsive parkinsonism with pyramidal

- signs due to atp13a2, pla2g6, fbxo7 and spatacs1 mutations. *Movement Disorders*, 25(12):1791–1800, 2010. ISSN 08853185. doi: 10.1002/mds.23221.
- M. G. Palmgren and P. Nissen. P-type atpases. *Annual Review of Biophysics*, 40(1):243–266, 2011. ISSN 1936-122X. doi: 10.1146/annurev.biophys.093008.131331.
- J. Park, S. Y. Kim, G. H. Cha, S. B. Lee, S. Kim, and J. Chung. Drosophila dj-1 mutants show oxidative stress-sensitive locomotive dysfunction. *Gene*, 361:133–139, 2005. ISSN 03781119. doi: 10.1016/j.gene.2005.06.040.
- J. Park, S. B. Lee, S. Lee, Y. Kim, S. Song, S. Kim, E. Bae, J. Kim, M. Shong, J. M. Kim, and J. Chung. Mitochondrial dysfunction in drosophila pink1 mutants is complemented by parkin. *Nature*, 441(7097):1157–1161, 2006. ISSN 00280836. doi: 10.1038/nature04788.
- J. S. Park, P. Mehta, A. A. Cooper, D. Veivers, A. Heimbach, B. Stiller, C. Kubisch, V. S. Fung, D. Krainc, A. Mackay-Sim, and C. M. Sue. Pathogenic effects of novel mutations in the p-type atpase atp13a2 (park9) causing kufor-rakeb syndrome, a form of early-onset parkinsonism. *Human Mutation*, 32(8):956–964, 2011. ISSN 10597794. doi: 10.1002/humu.21527.
- J. S. Park, B. Koentjoro, D. Veivers, A. Mackay-Sim, and C. M. Sue. Parkinson’s disease-associated human atp13a2 (park9) deficiency causes zinc dyshomeostasis and mitochondrial dysfunction. *Human Molecular Genetics*, 2014. ISSN 0964-6906. doi: 10.1093/hmg/ddt623.
- J. Parkinson. An essay on the shaking palsy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 14(2):223–236, 2002.
- A. C. Pawlyk. Novel monoclonal antibodies demonstrate biochemical variation of brain parkin with age. *Journal of Biological Chemistry*, 278(48):48120–48128, 2003. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M306889200.
- A. Petit. Wild-type pink1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by parkinson disease-related mutations. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40):34025–34032, 2005. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M505143200.
- A. Pilsl. Mechanistic insights into the function and dysfunction of parkin, an e3 ubiquitin ligase associated with parkinson’s disease, 2012.
- A. Pilsl and K. F. Winklhofer. Parkin, pink1 and mitochondrial integrity: emerging concepts of mitochondrial dysfunction in parkinson’s disease. *Acta Neuropathologica*, 123(2):173–188, 2012. ISSN 0001-6322. doi: 10.1007/s00401-011-0902-3.
- F. T. Pinto, G. R. Corradi, D. P. Hera, and H. P. Adamo. Cho cells expressing the human p5-atpase atp13a2 are more sensitive to the toxic effects of herbicide paraquat. *Neurochem Int.*, 60(3):243–248, 2012.

- A. Podhajska, A. Musso, A. Trancikova, K. Stafa, R. Moser, S. Sonnay, L. Glauser, and D. J. Moore. Common pathogenic effects of missense mutations in the p-type atpase atp13a2 (park9) associated with early-onset parkinsonism. *PLoS ONE*, 7(6):e39942, 2012. ISSN 1932-6203. doi: 10.1371/journal.pone.0039942.
- M. H. Polymeropoulos. Mutation in the -synuclein gene identified in families with parkinson's disease. *Science*, 276(5321):2045–2047, 1997. doi: 10.1126/science.276.5321.2045.
- P. Puigserver, Z. Wu, C. W. Park, R. Graves, M. Wright, and B. M. Spiegelman. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92(6):829–839, 1998. ISSN 00928674.
- E. Radi, P. Formichi, G. Di Maio, C. Battisti, and A. Federico. Altered apoptosis regulation in kufor-rakeb syndrome patients with mutations in the atp13a2 gene. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(8):1916–1923, 2012. ISSN 15821838. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01488.x.
- A. Ramirez, A. Heimbach, J. Gründemann, Stiller. B, D. Hampshire, L. P. Cid, I. Goebel, A. F. Mubaidin, A. L. Wriekat, J. Roeper, A. Al-Din, Am Hillmer, M. Karsak, B. Liss, C. G. Woods, M. I. Behrens, and C. Kubisch. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in atp13a2, encoding a lysosomal type 5 p-type atpase. *Nature Genetics*, 38(10):1184–1191, 2006. ISSN 1061-4036. doi: 10.1038/ng1884.
- D. Ramonet, A. Podhajska, K. Stafa, S. Sonnay, A. Trancikova, E. Tsika, O. Pletnikova, J. C. Troncoso, L. Glauser, and D. J. Moore. Park9-associated atp13a2 localizes to intracellular acidic vesicles and regulates cation homeostasis and neuronal integrity. *Human Molecular Genetics*, 21(8):1725–1743, 2012. ISSN 0964-6906. doi: 10.1093/hmg/ddr606.
- S. J. Riedl and G. S. Salvesen. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(5):405–413, 2007. ISSN 1471-0072. doi: 10.1038/nrm2153.
- S. J. Riedl and Y. Shi. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(11):897–907, 2004. ISSN 1471-0072. doi: 10.1038/nrm1496.
- U. T. Rüegg and B. Gillian. Staurosporine, k-252 and ucn-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 10(6):218–220, 1989. ISSN 01656147. doi: 10.1016/0165-6147(89)90263-0.
- E. I. Rugarli and T. Langer. Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons. *The EMBO Journal*, 31(6):1336–1349, 2012. ISSN 02614189. doi: 10.1038/emboj.2012.38.
- P. Saftig. *Lysosomes*. Medical intelligence unit. Landes Bioscience/Eurekah.com and Springer Science+Business Media, Georgetown and Tex and New York and N.Y, 2005. ISBN 9780387255620.

- L. Santoro, G. J. Breedveld, F. Manganelli, R. Iodice, C. Pisciotta, M. Nolano, F. Punzo, M. Quarantelli, S. Pappatà, A. Di Fonzo, B. A. Oostra, and V. Bonifati. Novel atp13a2 (park9) homozygous mutation in a family with marked phenotype variability. *neurogenetics*, 12(1):33–39, 2011. ISSN 1364-6745. doi: 10.1007/s10048-010-0259-0.
- S. A. Sarraf, M. Raman, V. Guarani-Pereira, M. E. Sowa, E. L. Huttlin, S. P. Gygi, and J. W. Harper. Landscape of the parkin-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization. *Nature*, 496(7445):372–376, 2013. ISSN 00280836. doi: 10.1038/nature12043.
- R. C. Scarpulla. Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 97(4):673–683, 2006. ISSN 0730-2312. doi: 10.1002/jcb.20743.
- R. C. Scarpulla. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiological Reviews*, 88(2):611–638, 2008. ISSN 0031-9333. doi: 10.1152/physrev.00025.2007.
- R. C. Scarpulla. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the pgc-1 family regulatory network. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(7):1269–1278, 2011. ISSN 01674889. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.09.019.
- M. Schieder, K. Rötzer, A. Brüggemann, M. Biel, and C. Wahl-Schott. Planar patch clamp approach to characterize ionic currents from intact lysosomes. *Sci Signal*, 3(151), 2011.
- K. Schmidt, D. M. Wolfe, B. Stiller, and D. A. Pearce. Cd²⁺, mn²⁺, ni²⁺ and se²⁺ toxicity to *saccharomyces cerevisiae* lacking ypk9p the orthologue of human atp13a2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 383(2):198–202, 2009. ISSN 0006291X. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.03.151.
- S. A. Schneider, C. Paisan-Ruiz, N. P. Quinn, A. J. Lees, H. Houlden, J. Hardy, and K. P. Bhatia. Atp13a2 mutations (park9) cause neurodegeneration with brain iron accumulation. *Movement Disorders*, 25(8):979–984, 2010. ISSN 08853185. doi: 10.1002/mds.22947.
- P. J. Schultheis, S. M. Fleming, A. K. Clippinger, J. Lewis, T. Tsunemi, B. Giasson, D. W. Dickson, Mazzulli, M. E. Bardgett, K. L. Haik, O. Ekhatior, A. K. Chava, J. Howard, M. Gannon, E. Hoffman, Y. Chen, V. Prasad, S. C. Linn, R. J. Tamargo, W. Westbroek, E. Sidransky, D. Krainc, and G. E. Shull. Atp13a2-deficient mice exhibit neuronal ceroid lipofuscinosis, limited -synuclein accumulation and age-dependent sensorimotor deficits. *Human Molecular Genetics*, 22(10):2067–2082, 2013. ISSN 0964-6906. doi: 10.1093/hmg/ddt057.
- C. Settembre, A. Fraldi, D. L. Medina, and A. Ballabio. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(5):283–296, 2013. ISSN 1471-0072. doi: 10.1038/nrm3565.
- J. H. Shin, H. S. Ko, H. Kang, Y. Lee, Y. I. Lee, O. Pletinkova, J. C. Troconso, V. L. Dawson, and T. M. Dawson. Paris (znf746) repression of pgc-1 α contributes to neurodegeneration in parkinson’s disease. *Cell*, 144(5):689–702, 2011. ISSN 00928674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.010.

- E. Sidransky, M. A. Nalls, J. O. Aasly, J. Aharon-Peretz, G. Annesi, E. R. Barbosa, A. Bar-Shira, D. Berg, J. Bras, A. Brice, C.-M. Chen, L. N. Clark, C. Condroyer, E. V. d. Marco, A. Dürr, M. J. Eblan, S. Fahn, M. J. Farrer, H.-C. Fung, Z. Gan-Or, T. Gasser, R. Gershoni-Baruch, N. Giladi, A. Griffith, T. Gurevich, C. Januario, P. Kropp, A. E. Lang, G.-J. Lee-Chen, S. Lesage, K. Marder, I. F. Mata, A. Mirelman, J. Mitsui, I. Mizuta, G. Nicoletti, C. Oliveira, R. Ottman, A. Orr-Urtreger, L. V. Pereira, A. Quattrone, E. Rogaeva, A. Rolfs, H. Rosenbaum, R. Rozenberg, A. Samii, T. Samaddar, C. Schulte, M. Sharma, A. Singleton, M. Spitz, E.-K. Tan, N. Tayebi, T. Toda, A. R. Troiano, S. Tsuji, M. Wittstock, T. G. Wolfsberg, Y.-R. Wu, C. P. Zabetian, Y. Zhao, and S. G. Ziegler. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in parkinson's disease. *N Engl J Med*, 361(17):1651–1661, 2009.
- A. B. Singleton, M. Farrer, J. Johnson, A. Singleton, S. Hague, J. Kachergus, M. Hulihan, T. Peuralinna, A. Dutra, R. Nussbaum, S. Lincoln, A. Crawley, M. Hanson, D. Maraganore, C. Adler, Cookson, M. Muentert, M. Baptista, D. Miller, J. Blancato, J. Hardy, and K. Gwinn-Hardy. alpha-synuclein locus triplication causes parkinson's disease. *Science*, 302(5646):841, 2003.
- D. M. Sørensen, M. J. Buch-Pedersen, and M. G. Palmgren. Structural divergence between the two subgroups of p5 atpases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797(6-7): 846–855, 2010. ISSN 00052728. doi: 10.1016/j.bbabo.2010.04.010.
- M. G. Spillantini, M. L. Schmidt, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes, and M. Goedert. Alpha-synuclein in lewy bodies. *Nature*, 388(6645):839–840, 1997. ISSN 00280836.
- B. Stiller. Charakterisierung der p-typ atpase ypk9 in saccharomyces cerevisiae als modell für die atp13a2-bedingte form der neurodegeneration, 2009.
- T. Taira, Y. Saito, T. Niki, S. M. Iguchi-Ariga, K. Takahashi, and H. Ariga. Dj-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO reports*, 5(2):213–218, 2004. ISSN 1469-221X. doi: 10.1038/sj.embor.7400074.
- S. W. Tait and K. Green. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(9):621–632, 2010. ISSN 1471-0072. doi: 10.1038/nrm2952.
- Y. Takahashi, K. Kako, H. Arai, T. Ohishi, Y. Inada, A. Takehara, A. Fukamizu, and E. Munekata. Characterization and identification of promoter elements in the mouse cox17 gene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1574(3):359–364, 2002. ISSN 01674781. doi: 10.1016/S0167-4781(01)00374-8.
- J. Tan, T. Zhang, L. Jiang, J. Chi, D. Hu, Q. Pan, D. Wang, and Z. Zhang. Regulation of intracellular manganese homeostasis by kufor-rakeb syndrome-associated atp13a2 protein. *Journal of Biological Chemistry*, 286(34):29654–29662, 2011. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M111.233874.

- R. E. Tanzi, K. Petrukhin, I. Chernov, J. L. Pellequer, W. Wasco, B. Ross, D. M. Romano, E. Parano, L. Pavone, L. M. Brzustowicz, M. Devoto, J. Peppercorn, A. I. Bush, I. Sternlieb, M. Pirastu, J. F. Gusella, O. Evgrafov, G. K. Penchaszadeh, B. Honig, I. S. Edelman, S. Scheinberg, IH, and T. C. Gilliam. The wilson disease gene is a copper transporting atpase with homology to the menkes disease gene. *Nature Genetics*, 5(4):344–350, 1993. ISSN 1061-4036.
- R. C. Taylor, S. P. Cullen, and S. J. Martin. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(3):231–241, 2008. ISSN 1471-0072. doi: 10.1038/nrm2312.
- C. Toyoshima, M. Nakasako, H. Nomura, and H. Ogawa. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 a resolution. *Nature*, 405(6787):647–655, 2000. ISSN 00280836.
- T. Tsunemi and D. Krainc. Zn^{2+} dyshomeostasis caused by loss of atp13a2/park9 leads to lysosomal dysfunction and alpha-synuclein accumulation. *Human Molecular Genetics*, 2013. ISSN 0964-6906.
- J. Ugolino, S. Fang, C. Kubisch, and M. J. Monteiro. Mutant atp13a2 proteins involved in parkinsonism are degraded by er-associated degradation and sensitize cells to er-stress induced cell death. *Human Molecular Genetics*, 20(18):3565–3577, 2011. ISSN 0964-6906. doi: 10.1093/hmg/ddr274.
- uniprot.org. Probable cation-transporting atpase 13a2, a. URL <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9NQ11>.
- uniprot.org. 60 kda heat shock protein, mitochondrial, b. URL <http://www.uniprot.org/uniprot/P10809>.
- uniprot.org. Mitochondrial import inner membrane translocase subunit tim44, c. URL <http://www.uniprot.org/uniprot/043615>.
- uniprot.org. Mitochondrial import receptor subunit tom20, d. URL <http://www.uniprot.org/uniprot/P35180>.
- uniprot.org. Voltage-dependent anion-selective channel protein 1, e. URL <http://www.uniprot.org/uniprot/P21796>.
- M. Usenovic, A. L. Knight, A. Ray, V. Wong, K. R. Brown, G. A. Caldwell, K. A. Caldwell, I. Stagljar, and D. Krainc. Identification of novel atp13a2 interactors and their role in -synuclein misfolding and toxicity. *Human Molecular Genetics*, 21(17):3785–3794, 2012a. ISSN 0964-6906. doi: 10.1093/hmg/dds206.

- M. Usenovic, E. Tresse, J. R. Mazzulli, J. P. Taylor, and D. Krainc. Deficiency of atp13a2 leads to lysosomal dysfunction, -synuclein accumulation, and neurotoxicity. *Journal of Neuroscience*, 32(12):4240–4246, 2012b. ISSN 0270-6474. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5575-11.2012.
- E. M. Valente. Hereditary early-onset parkinson’s disease caused by mutations in pink1. *Science*, 304(5674):1158–1160, 2004. doi: 10.1126/science.1096284.
- S. S. Vembar and J. L. Brodsky. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(12):944–957, 2008. ISSN 1471-0072. doi: 10.1038/nrm2546.
- C. A. Virbasius, J. V. Virbasius, and R. C. Scarpulla. Nrf-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new dna-binding domain conserved in a family of developmental regulators. *Genes & Development*, 7(12a):2431–2445, 1993. ISSN 0890-9369. doi: 10.1101/gad.7.12a.2431.
- J. V. Virbasius and R. Scarpulla. Activation of the human mitochondrial transcription factor a gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(4):1309–1313, 1994. ISSN 0027-8424.
- C. Vulpe, B. Levinson, S. Whitney, S. Packman, and J. Gitschier. Isolation of a candidate gene for menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting atpase. *Nature Genetics*, 3(1):7–13, 1993. ISSN 1061-4036.
- X. Wang, M. H. Yan, H. Fujioka, J. Liu, A. Wilson-Delfosse, S. G. Chen, G. Perry, G. Casadesus, and X. Zhu. Lrrk2 regulates mitochondrial dynamics and function through direct interaction with dlp1. *Human Molecular Genetics*, 21(9):1931–1944, 2012. ISSN 0964-6906. doi: 10.1093/hmg/dds003.
- L. S. Weingarten, H. Dave, H. Li, and D. A. Crawford. Developmental expression of p5 atpase mrna in the mouse. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 17(1):153–170, 2012. ISSN 1425-8153. doi: 10.2478/s11658-011-0039-3.
- B. Westermann. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(12):872–884, 2010. ISSN 1471-0072. doi: 10.1038/nrm3013.
- Williams, A. Hadeed, A. S. al Din, and Wreikat, AL, Lees, A. J. Kufor rakeb disease: Autosomal recessive, levodopa-responsive parkinsonism with pyramidal degeneration, supranuclear gaze palsy, and dementia. *Movement Disorders*, 20(10):1264–1271, 2005. ISSN 08853185. doi: 10.1002/mds.20511.
- W. W. Winder, B. F. Holmes, D. S. Rubink, E. B. Jensen, M. Chen, and J. O. Holloszy. Activation of amp-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 88(6):2219–2226, 2000.

- K. F. Winklhofer. Parkin and mitochondrial quality control: toward assembling the puzzle. *Trends in Cell Biology*, 2014. ISSN 09628924. doi: 10.1016/j.tcb.2014.01.001.
- Z. Wu, P. Puigserver, U. Andersson, C. Zhang, G. Adelmant, V. Mootha, A. Troy, S. Cinti, B. Lowell, R. C. Scarpulla, and B. M. Spiegelman. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator pgc-1. *Cell*, 98(1):115–124, 1999. ISSN 00928674. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80611-X.
- Z. Xie and D. J. Klionsky. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology*, 9(10):1102–1109, 2007. ISSN 1465-7392.
- Y. Yang, S. Gehrke, Y. Imai, Z. Huang, Y. Ouyang, J. W. Wang, L. Yang, M. F. Beal, H. Vogel, and B. Lu. Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of drosophila pink1 is rescued by parkin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(28):10793–10798, 2006. ISSN 0027-8424.
- Y. X. Yang, N. W. Wood, and D. S. Latchman. Molecular basis of parkinsons disease. *NeuroReport*, 20(2):150–156, 2009. ISSN 0959-4965. doi: 10.1097/WNR.0b013e32831c50df.
- W. Yin, A. P. Signore, M. Iwai, G. Cao, Y. Gao, and J. Chen. Rapidly increased neuronal mitochondrial biogenesis after hypoxic-ischemic brain injury. *Stroke*, 39(11):3057–3063, 2008. ISSN 0039-2499. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.520114.
- T. Yoshimori, A. Yamamoto, Y. Moriyama, M. Futai, and Y. Tashiro. Bafilomycin a1, a specific inhibitor of vacuolar-type h⁺-atpase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 266(26):17707–17712, 1991.
- R. J. Youle and D. P. Narendra. Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(1):9–14, 2011. ISSN 1471-0072. doi: 10.1038/nrm3028.
- R. J. Youle and A. Strasser. The bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1):47–59, 2008. ISSN 1471-0072. doi: 10.1038/nrm2308.
- J. J. Zarranz, J. Alegre, J. C. Gómez-Esteban, E. Lezcano, R. Ros, I. Ampuero, L. Vidal, J. Hoenicka, O. Rodriguez, B. Atarés, V. Llorens, E. Gomez Tortosa, T. del Ser, D. G. Muñoz, and J. d. Yebenes. The new mutation, e46k, of [alpha]-synuclein causes parkinson and lewy body dementia. *Ann Neurol.*, 55(2):164–173, 2004.
- L. Zhang, R. Sheng, and Z. Qin. The lysosome and neurodegenerative diseases. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 41(6):437–445, 2009. ISSN 1672-9145. doi: 10.1093/abbs/gmp031.

- A. Zimprich, S. Biskup, P. Leitner, P. Lichtner, M. Farrer, S. Lincoln, J. Kachergus, M. Hulihan, R. J. Uitti, D. B. Calne, A. J. Stoessl, R. F. Pfeiffer, N. Patenge, I. C. Carbajal, P. Vier-egge, F. Asmus, B. Müller-Myhsok, D. W. Dickson, T. Meitinger, T. M. Strom, Z. Wszolek, and T. Gasser. Mutations in *lrrk2* cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*, 44(4):601–607, 2004. ISSN 08966273.
- H. Zong, J. M. Ren, L. H. Young, M. Pypaert, J. Mu, M. J. Birnbaum, and G. Shulman. Amp kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(25):15983–15987, 2002. ISSN 0027-8424.